

Yago Pinto da Silva

**PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO
FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) NA MATURAÇÃO NUCLEAR
OOCITÁRIA, EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS E
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obten-
ção do Grau de Mestre em Biologia Ce-
lular e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Valério Valdetar
Marques Portela Junior

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Henri-
que Barreta

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Yago Pinto

PARTICIPAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO 18 (FGF18) NA MATURAÇÃO NUCLEAR OOCITÁRIA, EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS / Yago Pinto Silva ; orientador, Valério Marques Portela ; coorientador, Marcos Henrique Barreta. - Florianópolis, SC, 2015.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Reprodução Animal. 3. FIV. 4. Blastocisto. I. Portela, Valério Marques. II. Barreta, Marcos Henrique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Este trabalho é dedicado aos todos
aqueles que auxiliaram seu desenvolvi-
mento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Valério Portela e Marcos Barreta por concederem a mim a confiança para execução do projeto, pelos auxílios, transmissão de conhecimentos e conversas em prol de meu desenvolvimento científico

A meus pais e minha família, por todo carinho e empenho destinados a mim

Ao amigo André Goetten, por toda a parceria durante a execução dos projetos, apreço e pela amizade

Aos membros da equipe do LAFRA, por todo auxílio em diferentes etapas

Ao amigo Adriano T. Ramos, por sua solicitude, ensinamentos, contribuições para o desenvolvimento deste estudo e principalmente pela amizade.

Aos queridos Esdras Correa, Camile Peretti, Cecilia Constantino, Janyni Duz, Victória Zortéa, Marthiellen Roosevelt e Mateus Borges pelos momentos de descontração em Curitiba

Aos colegas de sala Willian Goldoni, Ricardo Delcastanher e Tienko Victor pela companhia e conversas

À profa. Fracielli Zimmermann durante os períodos de estágio docência, contribuindo de modo significativo para minha formação docente

Aos técnicos de laboratório: Gabriel Olivo, Renata Schmidt, Claudio Jr. e Helder Ricardo pelo auxílio prestado

Aos amigos da Pós Graduação: Viviane Polli, Lucia Acuña, Lucas Bitencourt, Mauricio Cunha, Ana Ramos, Fernanda Kokovickz, Mauro Ramirez, Daniela Coelho, Emily Bruna, Rafael Scoz, Christian Bonatto, Thaline Quadros, Luciane Nezzi, Heloisa Schram, Fernando Mazur, Gilian Bourckhardt, Francis Pazini. Meus sinceros agradecimentos pela amizade.

Aos amigos que trouxe comigo: Aline Seabra, Aline Melo, Bárbara Martins, Cecília Manoel, Dael Magno, Danilo Souza, Dayane Goes, Felipe Tuji, Giovanni Veiga, Nayara Lins Xérlem, Gustavo Bramatti, Hanna Lobato Xérlem, Jessica Bezerra, Lucas Kizan, Luana Santana, Margarida Conceição, Olenka Colares, Rossana Brito, Thamys Coelho, Thiago Grazilio e Vitor Queiroz. Cada um de vocês fez parte desta vitória em algum momento específico. Minha eterna gratidão a todos.

Aos professores Luiz Henkes, Sandra Arenhart, Marcello Machado e Alexandre Tavela, pelas conversas e amizade

A todos os membros da equipe UFSC-Curitibanos pelo acolhimento e auxílio

Aos membros do Frigorífico El' Golli ® de Taió-SC pelo auxílio essencial para o desenvolvimento desta pesquisa

Ao CAV-UDESC, em especial ao prof. Alceu Mezzalana

Ao prof. Christopher Price

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro destinado a este trabalho

RESUMO

Este trabalho propôs estudar a ação do Fator de Crescimento Fibroblástico 18 (FGF18) durante o processo de expansão das células do cúmulus, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial. Os experimentos desenvolvidos utilizaram ovários provenientes de abatedouro e maturados durante 24h em meio de cultura suplementados ou na ausência de diferentes dosagens de FGF18 dependendo do ensaio proposto. O primeiro experimento desenvolvido utilizou 24 Complexos do cúmulus oophorus (CCOs) e avaliou diferentes doses de Hormônio folículo estimulate (FSH) (0, 1, 10, 50, 100 e 500 ng/ml) a fim de obter concentrações com diferentes efeitos sobre a expansão das células do cúmulus. Neste experimento, foi demonstrado que a suplementação do meio de maturação *in vitro* com 100 e 500 ng/ml ($P < 0,05$) resultam na expansão das células do cúmulus, sendo a dose de 500 ng/ml culminar em uma maior taxa de expansão. O segundo experimento visou avaliar a maturação nuclear de CCOs após o período de incubação com 100ng/ml de FGF18 nas concentrações de FSH do experimento 1. Após o período de incubação da maturação *in vitro*, oócitos foram fixados e corados com HOESCHT-33342 para avaliar a taxa de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II da meiose. Os resultados deste experimento demonstram que FGF18 não influenciou a maturação oocitária ($P < 0,05$). O experimento 3 visou avaliar diferentes concentrações de FGF18 (100, 500 e 1000 ng/ml) sobre a maturação oocitária e expansão das células do cúmulus durante o período de incubação de 24h. Foram utilizados 50 CCOs por grupo em quatro replicações. Foi demonstrado que FGF18 não afetou a maturação e expansão dos CCOs nos grupos avaliados ($P < 0,05$). O quarto experimento avaliou a suplementação de FGF18 em diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões. Foram elaborados três grupos: controle (ausência de FGF18 em todas as etapas), FGF-MIV (CCOs tratados somente durante a maturação *in vitro* (MIV) com 100ng/ml de FGF18) e FGF-CIV (zigotos tratados somente durante o cultivo *in vitro* (CIV) com 100 ng/ml de FGF18). Os resultados apresentam menores taxas quantitativas e qualitativas no grupo FGF-CIV ($P < 0,05$). O experimento 5 teve como objetivo avaliar a expressão de diferentes genes (GADD54B, 53BP1, RAD52, Interferon-tau, FasL e Cox2) nos grupos do experimento 4. Apenas COX2 se apresentou menos expresso no grupo FGF-MIV. Conclui-se que o FGF18 não influencia nos processos de expansão das células do cúmulus e maturação oocitária. No entanto, foi observado que a suplementação deste fator às eta-

pas da PIV reduz a taxa de embriões produzidos, tal como retardo no desenvolvimento destas células, entretanto, os mecanismos moleculares no controle deste evento ainda não estão elucidados.

Palavras-chave: Blastocisto. FIV. Reprodução Animal.

ABSTRACT

This work proposed to study the Fibroblast Growth Factor 18 (FGF18) during the cumulus expansion, oocyte maturation and the early embryo development. The experiments used ovaries from slaughterhouses and matured for 24 hours in culture medium in the presence or not of FGF18 depending on the proposed test. The first experiment used 24 cumulus-oocyte complex (COCs) to evaluate different doses of follicle stimulating hormone (FSH) (0, 1, 10, 50, 100 and 500 ng / ml) to obtain concentrations with different effects on the expansion of the cumulus cells. This experiment demonstrated that supplementation of the *in vitro* maturation medium with 100 and 500 ng / ml ($P < 0.05$) result in cumulus expansion. The dose of 500 ng/ml culminate in an increased growth rate. The second experiment aimed evaluate the COC's nuclear maturation after incubation period with 100 ng/ml FGF18, using the FSH doses of the first experiment. After the *in vitro* maturation, oocytes were fixed and stained with Hoechst 33342 to evaluate the rate of oocytes that reached the metaphase II stage. The results of this experiment demonstrate that FGF18 did not affect oocyte maturation ($P < 0.05$). The third experiment was performed to evaluate different concentrations of FGF18 (100, 500, and 1000 ng / ml) on oocyte maturation and cumulus expansion during the 24 h incubation period. 50 COCs were used per group on four replicates. It was shown that FGF18 did not affect the maturation and expansion of COCs in the study groups ($P < 0.05$). The fourth experiment evaluate the supplementation of FGF18 in different stages of *in vitro* production. Three groups were established: control (absence of FGF18 in all stages), FGF-IVM (COCs treated only during *in vitro maturation* (IVM) with 100 ng / ml FGF18) and FGF-IVC (zygotes treated only during the *in vitro cultive* (IVC) 100 ng / ml FGF18). The results show lower rates qualitative and quantitative FGF-IVC group ($P < 0.05$). The experiment 5 aimed to evaluate the expression of different genes (GADD54B, 53BP1, RAD52, interferon-tau, FasL and COX 2) in the embryos derived of the fourth assay. Only COX2 was downregulated in the FGF-IVM group. We conclude that the FGF18 does not influence the processes of the cumulus expansion cells and oocyte maturation. It was observed that FGF18 supplementation to the IVP steps reduces the rate of embryo production, such as delay in the development of these cells, however, the molecular mechanisms involved in this event are not deciphered.

Keywords: Blastocyst. IVF. Animal Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1: Tabela1: Sequência dos genes avaliados. A: sequência Antissenso; S: sequência senso; 1 (Bettegowda et al, 2006), 2 (Portela et al, 2010); 3 (Barreta et al, 2012); 4 (Portela et al, 2015); 5 (Hirayama et al, 2014); 6 (El-Sayed et al 2006).....44

Figura 1: Efeito de diferentes doses de FSH (0, 1, 10, 50, 100 e 500 ng/ml) na expansão de CCOs após 0h, 12h, 18h e 24h de maturação *in vitro*. Foram realizadas quatro replicadas com 24 CCOs por grupo, totalizando 576 CCOs no experimento. Letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. (P<0,05).....52.

Figura 2: Figura 2: Efeito de diferentes doses de FGF18 (0, 100, 500 e 1000 ng/ml) na expansão das células do cumulus após 0h, 12h, 18h e 24h de diferentes concentrações de FSH (apenas 500 ng/ml é ilustrado). As células foram observadas e fotodocumentadas durante o período de maturação. Foram realizadas quatro replicatas. A (horário) + hora de observação após maturação (0, 12, 18 e 24h) (p<0,05). Valores representam área expandida em mm². Foram realizadas quatro repetições para este experimento (n=12 por grupo).....53

Figura 3: Gráfico representando em porcentagem a taxa de oócitos que atingiram a metáfase II após 24h de tratamento sobre diferentes concentrações de FSH (0, 50, 100 e 500 ng/ml) e FGF (100ng/ml). As células foram observadas após 24h de maturação e coradas com Hoescht – 33342. Foram realizadas quatro replicadas. Letras diferentes representam diferenças entre os grupos (p<0,05).....54.

Figura 4: Efeito de diferentes doses de FGF18 (0, 100, 500 e 1000 ng/ml) na expansão das células do cumulus após 0h, 12h, 18h e 24h de tratamento. Foram realizadas quatro replicadas com 40 CCOs por grupo, totalizando 640 CCOs no experimento. (P<0,05).....55.

Figura 5: Taxa de clivagem (A) e porcentagem de Blastocistos produzidos *in vitro* (B) em meio suplementado de FGF18. Letras demonstram a diferença entre os grupos (P<0,05).....57.

Figura 6: Número de Blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento produzidos *in vitro* na presença ou não de FGF18. Letras demonstram a diferença entre os grupos. (P<0,05).....58.

Figura 7: Expressão relativa dos genes 53BP1, COX2, GADD45B, Interferon-Tau, RAD52 e FasL durante a produção *in vitro* de embriões na ausência de tratamento suplementado com FGF18 (Controle); Blastocistos tratados durante a Maturação *in vitro* dos CCOs (FGF18 MIV); Blastocistos tratados durante o Cultivo *in vitro* dos zigotos (FGF18 CIV). nd (sem expressão). * representa a diferença estatística entre os tratamentos (P<0,05). Dados obtidos após quatro replicações do experimento. Dados expressos como média.....60.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Média da área dos CCOs submetidos a tratamentos em diferentes concentrações de FSH e avaliados em períodos distintos. Erro Padrão (EP); Número de CCOs (n); Hora (h). ($P < 0,05$).....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2B HSD: 2 Beta Hiroxisteróide
ADAM: Desintegrina e Metaloproteinase
AREG: Ampirregulina
EREG: Epirregulina
BTC: Betacelulina
RT- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo real
CCO: Complexo Cúmulus Oophorus
CGP: Células Germinativas Primordiais
CIV: Cultivo *in vitro*
COX2: Cicloxygenase 2
CYP: Aromatase
DNA: Ácido Desoxirribunocleico
E2: Estradiol
EGF: Fator de crescimento Epidermal
EGFR: Receptor de EGF
AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina
FGF: Fator de Crescimento Fibroblástico
FGFR: Receptor de FGF
FIV: Fertilização *in vitro*
FSH: Hormônio Folículo Estimulante
GADD45B: Enzima Interrupção de crescimento e dando induzível ao DNA
GC: Células da Granulosa
GMPc: Monofosfato Cíclico de Guanosina
HA: Ácido Hialurônico
HAS2: Hialuronana Sintase
IGF: Fator de Crescimento semelhante a insulina
LH: Hormônio Luteinizante
MEC: Matriz Extracelular
MII: Meiose II
MIV: Maturação *in vitro*
RNAm: Ácido Ribonucleio mensageiro
PIV: Produção *in vitro* de embriões
P4: Progesterona
PG: Prostaglandina
PTX3: Pentaxina 3
SPRY: Sprout
sTAR: Proteína de regulação precisa esteroiogênica

TSG6: Proteína indutora do fator de necrose tumoral 6
VG: Vesícula Germinativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. HIPÓTESE.....	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo Geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÃO.....	65
Referências.....	67

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões em bovinos é uma biotécnica da reprodução amplamente difundida e eficaz para a produção de embriões de modo quantitativo e qualitativo (THIBIER, 2005). Em escala global, são registrados 443,533 embriões produzidos *in vitro* no ano de 2012 (IETS, 2013). Esta técnica é empregada nos setores agropecuários brasileiros. O Brasil está entre os maiores produtores de embriões, sendo registrado um total de 289,952 embriões produzidos no país no ano de 2008. Destes embriões, 220,425 foram derivados de sistemas *in vitro*, fazendo com que o Brasil lidere o ranking de aplicação da produção *in vitro* de embriões (PIV) em escala global. (VIANA et al, 2010). No entanto, diversos estudos apontam o inferior potencial de viabilidade de embriões produzidos *in vitro* em relação aos embriões produzidos *in vivo*. Dentre os fatores podemos citar o limitado conhecimento fisiológico envolvido na regulação da maturação do oócito, expansão das células do cúmulus, tal como a interação sinérgica entre ambos (SUGIURA et al, 2007; SUTTON-MCDOWALL et al, 2012; VANDERHYDEN, 1993; YANG, X. et al, 1998).

Muitos trabalhos demonstram a variedade de moléculas envolvidas no processo de maturação oocitária em mamíferos (YANG, X. et al, 1998; YE et al, 2010; ZHANG, K.; HANSEN; EALY, 2010; ZHANG, X. et al, 2010). Esta regulação envolve um orquestrado fluxo de proteínas, hormônios e fatores de crescimento que culminam com a formação do oócito no ambiente folicular. Estas condições, no entanto, não são mimetizadas *in vitro* de modo satisfatório, sendo atingida a marca de 30 a 40% em média de oócitos que atingem o estágio de Blastocisto (BRACKETT, 1985; LONERGAN; FAIR, 2008). Alguns fatores são apontados para justificar este resultado, tais como as condições ideais de temperatura e umidade, carência de suplementos no meio de cultivo e utilização de células de qualidade inferior ou em processo apoptótico (SMITZ; CORTVRINDT, 2002; SONGSASEN et al, 2009; SUDIMAN et al, 2014; SUGIURA et al, 2007; YAMADA et al, 2007).

A obtenção de oócitos para a utilização de biotécnicas da reprodução enfrenta um problema que consiste na qualidade inferior das células obtidas, no entanto, a baixa qualidade não está totalmente esclarecida. É de conhecimento que a interação do oócito com as células do cúmulus, em um complexo chamado “Complexo do Cumulus-Oophorus” (CCO) é essencial para a formação e desenvolvimento do gameta feminino (HANSEN, 2006; SIRARD; BLONDIN, 1996; SIRARD et al, 2006).

Diversas moléculas são envolvidas neste processo, sendo amplamente discutidas a fim de obter respostas que auxiliem na compreensão deste processo, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Entre as moléculas envolvidas neste processo, estão envolvidas o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) (XIAO et al, 2014), Hormônio Luteinizante (LH, do inglês *luteinizing hormone*) (MERTON et al, 2003), Fator de crescimento epidermal (EGF, do inglês *epidermal growth factor*) (YAMASHITA; SHIMADA, 2012), Angiotensina II (AngII) (SCHAUSER et al, 2001), Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF, do inglês *insulin-like growth factor*) (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000) e mais recentemente a família dos Fatores de crescimento Fibroblásticos (FGF, do inglês *fibroblast growth factor*). A suplementação *in vitro* destes compostos permitem a viabilidade e desenvolvimento do oócito até metáfase II, momento este em que a maioria dos animais domésticos está apta a executar o processo de fecundação (SIRARD, 2001; SIRARD et al, 2006; SPILLER; BOWLES; KOOPMAN, 2012; TAMURA; HUANG; MARIKAWA, 2013; WHITFIELD et al, 2013).

Pesquisadores vem relatando ao decorrer dos anos a ação de FGFs a regulação do folículo ovariano e oogênese, tais como os FGF2 (ZHONG et al, 2006), FGF 7 (CHO et al, 2008), FGF 8 (SUGIURA et al, 2007), FGF10 (ZHANG, K.; HANSEN; EALY, 2010), FGF17 (MARUOKA et al, 1998) e mais recentemente FGF18. FGF18 foi recentemente descrito por nosso grupo de pesquisa como um fator pró apoptótico em células murais da granulosa (GC) de folículos ovarianos de *Bos taurus* (PORTELA et al, 2010). Onde, GCs cultivadas *in vitro* com FGF18, sofreram degradação de DNA, bloqueio de genes chave para esteroidogênese, regulação folicular e para proteção a danos ao material genético. Já nos folículos, os mais afetados pela adição deste fator foram os subordinados em relação aos dominantes. Altas concentrações de FGF18 promoveram maiores danos moleculares e consequentemente desencadearam o processo de atresia folicular (PORTELA et al, 2015; PORTELA et al, 2010).

A secreção de FGF18 ocorre principalmente pelas células da Teca (TC) e minoritariamente pelas GC, sendo liberado no líquido folicular (PORTELA et al, 2010). Os CCOs, por sua vez, mantêm contato direto com o líquido folicular ovariano e consequentemente com FGF18. Tanto as células do cúmulus quanto os oócitos apresentam receptores para FGF18, porém, até o presente estudo, não haviam relatos sobre sua interferência de FGF18 no desenvolvimento de oócitos e blastocistos. Contudo, se sabe que FGF18 intimamente ligado aos processos de condrogênese e osteogênese em embriões e fetos (NAGAYAMA et al, 2013;

OHBAYASHI et al, 2002), tal como empregado em ensaios clínicos para regeneração tecidual condrogênica (MORI et al, 2014). Estas informações nos levam a questionar qual a influência de FGF18 sobre o processo de desenvolvimento do CCO.

1.1. Maturação do oócito

Oócitos são células haploides com origem derivada de células germinativas primordiais, inicialmente encontradas nas margens do disco embrionário durante a gastrulação. Estas células migram através da região da linha primitiva durante a formação dos folhetos germinativos para a região da crista gonadal indiferenciada. Estas células migratórias são denominadas como células germinativas primordiais (CGP) (ALLEN; WILSHER, 2009; FERNER; MESS, 2011; SPILLER; BOWLES; KOOPMAN, 2012). As CGP seguem em direção à região da crista gonadal, onde iniciam o processo de colonização da região para posteriormente originar a gônada primitiva.

O início da primeira divisão meiótica em fetos bovinos inicia em torno de 72 a 82 dias gestação (ERICKSON, 1966). Em muitos mamíferos, o evento do desenvolvimento do oócito é caracterizado por dois períodos de quiescência celular na divisão meiótica: um durante a prófase I e um segundo em metáfase II (ERICKSON, 1966; ZAMBRANO et al, 2014).

O primeiro evento de quiescência é denominado “estado de vesícula germinativa” (VG), onde o oócito pode permanecer em estágio de diplóteno da prófase I até o momento do recrutamento do folículo ovariano, promovendo a ovulação ou iniciando o processo de atresia. O folículo ovariano é o responsável por manter o oócito em VG, especialmente as células da teca, impedindo dessa forma, sua progressão ao estágio de metáfase II (momento este em que o oócito é considerado como maduro). A manutenção do oócito no estágio de vesícula germinativa, pelas células da teca, não é completamente elucidada e os fatores que compõe esse mecanismo são pouco conhecidos (SIQUEIRA et al, 2012). Na maioria das espécies domésticas a foliculogênese também é crucial para a retomada da meiose no período de maturação. A retomada da meiose é um processo ainda não bem elucidado, porém, é de conhecimento a sua íntima dependência dos picos de LH das ondas foliculares. Em bovinos, LH possui o papel de luteinização, ente alteração no ambiente endócrino do folículo dominante, reduzindo a taxa de E2 e aumentando P4 no líquido folicular expansão das células do cúmulus e granulosa, maturação do oócito (FAIR; LONERGAN, 2012) e consequente, o rompimento da vesícula

germinativa (GVBD) (PENG et al, 1991). Este último evento ocorre por intermédio das GC e teca, uma vez que, o receptor para o LH não é expresso no oócito bovino (NUTTINCK et al, 2004) e fracamente expresso pelas células do cúmulus (PENG et al, 1991; RICHARDS et al, 2002).

As células da granulosa em resposta ao LH iniciam processos de sinalizações autócrinas e parácrinas com as células do cúmulus. Em camundongos, este processo se inicia com a secreção de membros da família *EGF-like*: Ampirregulina (AREG), Epirregulina (EREG) e Betacelulina (BTC), estas por sua vez, ao ativarem seus receptores estimulam sua própria síntese (CONTI et al, 2006; SHIMADA et al, 2006). Em animais domésticos, como bovinos e suínos, o processo fisiológico atua de maneira similar, entretanto, BTC não é regulado pelas gonadotrofinas das células do cúmulus, ao contrário de AREG e EREG (PROCHAZKA et al, 2000). A ativação dos *EGF-like* se dá através da ação de LH a seu ligar a seu receptor (LHR) nas GC, desencadeando vias clássicas de sinalização, como a ERK1/2 e AMPc. Realizada a ativação, os *EGF-like* são sintetizados e posteriormente clivados pelos membros da família desintegrina e metaloproteinasas (ADAM) para então ativar o receptor de EGF (EGFR) nas células do cumulus, resultando na fosforilação da via ERK1/2 (BEN-AMI et al, 2006). Esta ativação então induz a maturação nuclear do oócito e a produção de várias proteínas necessárias para a expansão do cumulus, tais como a prostaglandina sintetase 2 (COX2), a hialurona sintetase 2 (HAS2), a proteína indutora do fator de necrose tumoral 6 (TSG6) e a pentraxina 3 (PTX3) (CONTI et al, 2006; FAN et al, 2009; SHIMADA et al, 2006).

COX2 é sintetizada em GC e células do cúmulus, estando diretamente associada ao desenvolvimento de expansão do CCO e ovulação. Está envolvida no processo de síntese das Prostaglandinas (PG), dentre elas, a PGE (GOOVAERTS et al, 2009; NUTTINCK et al, 2004). Em ovários de mamíferos, COX2 foi encontrada em células do cúmulus e GC após indução por LH, sendo essencial a produção de COX2 durante o período pré ovulatório para a maturação do oócito e expansão do CCO, sendo observado em camundongos um comprometimento fisiológico de expansão do CCO, maturação do oócito e ovulação com a redução de COX2 (DAVIS et al, 1999; RICHARDS et al, 2002; SIQUEIRA et al, 2012). O bloqueio de COX2 influenciou negativamente também a expressão de TSG6 em camundongos e suínos (GERSHON et al, 2007; OCHSNER et al, 2003; TAKAHASHI et al, 2006; YAMASHITA et al, 2011), um outro gene responsável pelo remodelamento de matriz em CCOs através da ligação ao ácido hialurônico (HA), estabilizando da hialuronana presentes na matriz (CONTI et al, 2006). TSG6 possui sua expressão aumentada em

GC e em células do cúmulus após picos de LH (OCHSNER et al, 2003). Camundongos com expressão de TSG6 prejudicada, apresentam falhas na expansão do CCO devido a não estabilização da MEC (FULOP, 2003).

Além dos fatores *EGF-like*, a progesterona, prostaglandinas E2 (PGE2) e F2 alfa (PGF2alfa) e a angiotensina II (AngII) também podem ser citados mediadores parácrinos das gonadotrofinas durante o reinício da meiose e expansão das células do cúmulus (BARRETA et al, 2008; PARK et al, 2004; SIQUEIRA et al, 2012). A expansão do CCO está diretamente ligada com a ativação da via ERK1/2, visto que esta via é necessária para manutenção do fator promotor da maturação (MPF) e do segundo bloqueio meiótico (HASHIMOTO et al, 1994). ERK1/2 também está envolvida no retorno da meiose através do fechamento de junções GAP através da perda do efeito inibitório de Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC) e Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPc) (HSIEH; CONTI, 2005). AMPC em bovinos é caracterizado por promover inibição temporária no rompimento da vesícula germinativa mas não impede que os oócitos atinjam MII. Contudo, em outras espécies, AMPC exerce função inibitória na maturação nuclear de oócitos, prejudicando desta forma o desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2001; SIRARD; BLONDIN, 1996).

1.2. Formação do Blastocisto

O desenvolvimento de um oócito até o estágio de blastocisto em condições *in vitro* é um processo amplamente estudado devido a sua grande complexidade, uma vez que, durante os eventos de maturação citoplasmática e nuclear, este deve responder a sinalizações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A falha em qualquer um desses eventos levarão conseqüentemente ao prejuízo no desenvolvimento embrionário (KOJI SUGIURA; MARILYN J. O'BRIEN, 2005; SUGIURA et al, 2007; WIGGLESWORTH et al, 2013). Como previamente descrito, o processo de maturação nuclear se caracteriza pelo rompimento da vesícula germinativa, além da condensação da cromatina e a extrusão do corpúsculo polar (ECKERT; NIEMANN, 1995; LEIBFRIED; FIRST, 1979), enquanto que no citoplasma, ocorrem os eventos de síntese e redistribuição de organelas, alterações moleculares, síntese de proteínas e cavéolas através de reações fosforilativas e desfosforilativas (NAVARRO, 2008; YANG, X. et al, 1998).

Este processo, apesar de sua complexidade fisiológica, é realizado *in vitro* para âmbitos de pesquisa, comercialização e conservação de espé-

cies. Para isso, é necessário avaliar condições atmosféricas, de temperatura do cultivo, armazenamento celular (BLONDIN et al, 1997), osmolaridade, pH dos meios de cultivo (COLLADO-FERNANDEZ; PICTON; DUMOLLARD, 2012; KHURANA; NIEMANN, 2000), qualidade dos oócitos obtidos, a integridade das células do cúmulus (KRISHER, 2004; SIRARD et al, 2006), além do conhecimento do tempo de maturação específico da espécie utilizada (HYTTEL et al, 1997; PAUL; KNOTT, 2014; THIBIER, 2005; ZHANG, X. et al, 2010).

Mesmo com estes diversos parâmetros harmonicamente organizados, a qualidade de embriões produzidos *in vitro* é inferior aos *in vivo*, quando avaliados quanto a sua viabilidade e qualidade de desenvolvimento. Dentre o total de oócitos submetidos à etapa de fertilização *in vitro* (FIV), apenas 40% alcançam o estágio de blastocistos (BRACKETT, 1985; LONERGAN; FAIR, 2008; RIZOS et al, 2002). Para que esse desenvolvimento ocorra, diversos genes precisam ser ativados para o ideal desenvolvimento *in vitro* de blastocistos. Dentre os genes envolvidos, podemos citar Interferon-tau e Cox2, que são responsáveis pelo desenvolvimento do blastocisto e sua implantação no endométrio (EL-SAYED et al, 2006; KUBISCH et al, 2001; POMINI PINTO et al, 2014).

Interferon tau é um Interferon tipo I secretado por embriões bovinos e ovinos, e está diretamente ligado com o reconhecimento materno-fetal. A baixa síntese desta molécula resulta em um inadequado desenvolvimento placentário, baixa interação materno fetal e não formação da blastocele. O prejuízo nestes eventos resulta na inviabilidade embrionária (ALLEN; WILSHER, 2009; BERTOLINI et al, 2002; KUBISCH; JOHNSON, 2007; SAWYER et al, 2002). Durante o desenvolvimento, a expressão de RNAm de Interferon-tau é inicialmente encontrado em blastocistos, porém ausente em mórula. Com base nesta informação, Kubish et al (2001) sugerem que este gene está intimamente ligado à formação da blastocele em bovinos. Durante o cultivo de blastocistos a secreção de interferon-tau é continua, sendo sintetizado em maiores taxas em blastocistos tardios em relação a blastocistos mais iniciais (KUBISCH; RASMUSSEN; JOHNSON, 2003; SAWYER et al, 2002). Interferon tau também foi detectado como um importante gene para o cultivo de blastocistos, tendo sua taxa de expressão diretamente proporcional a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (KUBISCH; JOHNSON, 2007; KUBISCH et al, 2001; KUBISCH; RASMUSSEN; JOHNSON, 2003).

COX2 é um importante gene para a biossíntese de prostaglandinas, sendo relacionadas à implantação e desenvolvimento do blastocisto e para o processo de decidualização em diversas espécies (EL-SAYED et al,

2006; LIM et al, 1999). Além disso, está diretamente ligada ao alongamento embrionário e ao processo de eclosão do blastocisto, estágio onde o blastocisto é liberado da zona pelúcida (EL-SAYED et al, 2006; HUANG, J. C. et al, 2004). Desta forma, assim como ocorre com a expressão de Interferon-tau, a baixa expressão deste gene em blastocistos compromete seu desenvolvimento (EL-SAYED et al, 2006; GOMEZ et al, 2009).

Além da ativação de genes indicadores da viabilidade, há a expressão ligada diretamente a danos no material genético de diferentes linhagens celulares, incluindo blastocistos, tais como, 53BP1, RAD52 e GADD45B (BARRETA et al, 2012; LOK; POWELL, 2012; VAIRAPANDI et al, 2002). RAD52 e 53BP1 são associados ao mecanismo de recombinação homóloga, sendo relacionadas a formação de junções Holliday. Barreta et al (2012) associaram a elevada expressão de RNAm destes genes a embriões com menor viabilidade desenvolvimento ao comparado com o grupo controle. Este mesmo estudo identificou aumento na expressão relativa de RAD52 e 53BP1 em embriões submetidos a irradiação UV, indicando danos ao DNA.

Desta forma, 24h a 36h após a fecundação, a modulação dos genes anteriormente citados permite aos zigotos realizarem suas primeiras clivagens e com o passar do período inicial de desenvolvimento, podemos obter zigotos com aproximadamente 32 blastômeros, sendo denominados como “Mórulas” (KHURANA; NIEMANN, 2000; SIRARD; BLONDIN, 1996; WATSON et al, 1999). Inicialmente, as células da mórula apresentam formatos semelhantes, todavia, as células mais exteriores iniciam um processo de formação de epitélio e através da expressão de caderinas específicas. Este processo é conhecido como “compactação”, onde as células da camada externa originarão o trofoectoderma (WATSON et al, 1999). A formação de uma cavidade denominada “blastocelo” preenchida por líquidos no interior da mórula caracteriza o estágio inicial da Blastulação. Assim, ao final desta cadeia de eventos, temos o blastocisto em estágio inicial (Bi) propriamente dito. Nesta fase, o blastocito possui aproximadamente 100 a 200 células, uma pequena blastocelo e duas distintas regiões, a massa celular interna (MCI) que originará os tecidos somáticos do embrião e anexos embrionários, além do trofoectoderma que originará a região embrionária da placenta, o cório (BETTERIDGE, 2007; PETER, 2013). Outras moléculas envolvidas neste processo são conhecidas como Fatores de crescimento fibroblásticos, que por sua vez, atuam em distintas etapas deste processo, promovendo maior viabilidade embrionária, descritas a seguir.

1.3. O sistema Fatores de Crescimento fibroblástico

Diversos morfógenos são descritos como elementos envolvidos em processos fisiológicos, reparo tecidual, desenvolvimento embrionário e metabolismo. Dentre eles podemos citar os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), estudados em diversos modelos animais, como roedores, humanos e bovinos (ANTOINE et al, 2005; BURATINI et al, 2005; LAVRANOS et al, 1994; STEPANENKO; VASSETZKY; KAVSAN, 2013). Estas proteínas são expressas tanto em tecidos adultos quanto em desenvolvimento, sendo inicialmente descritas como fatores mitogênicos de fibroblastos isolados de tecidos neurais. Sua atividade está relacionada a fatores pró angiogênicos, desenvolvimento embrionário, regeneração tecidual e oncogênese. Estando presentes em diferentes etapas da formação do indivíduo, tal como detectada em variados sistemas orgânicos sugerem um papel regulatório essencial para a manutenção de processos vitais (IGARASHI, 1998). Essas proteínas também vem sendo empregadas em pesquisas biomédicas, tais como patologias e oncologia (KONECZNY et al, 2014; MENG et al, 2013; SONVILLA et al, 2010), biologia do desenvolvimento e reprodução animal (FORD-PERRISS; ABUD; MURPHY, 2001; HUANG, X. et al, 2014; IGARASHI, 1998) Farmacologia (IMAMURA, 2014) e pesquisa básica (OHBAYASHI, 1998; SPIVAK-KROIZMAN; et al, 1994).

São conhecidos 23 membros de FGFs em mamíferos, que por sua vez são agrupados de acordo com sua similaridade filogenética, locus gênico e composição bioquímica, sendo classificados em subfamílias (ITOH, 2010). Foram estabelecidos três grupos para as subfamílias de FGF: os intracelulares (FGF 11/12/13/14), endócrinos (FGF 19/21/23) e canônicos (FGF 1/2/5, FGF 3/4/6, FGF 7/10/22, FGF 8/17/18 e FGF 9/16/20) (ITOH; ORNITZ, 2004). Os FGFs de via canônica atuam através de receptores tirosina quinase. Estes receptores são descritos como cinco receptores de alta afinidade, codificados por quatro genes distintos, resultando em quatro receptores Tirosina quinase (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4) (ITOH; ORNITZ, 2004), que por sua vez estão localizados na membrana celular. A ativação de FGFR por FGF é realizada exclusivamente com a presença do cofator glicosaminoglicanos (GAG), especialmente heparan sulfato (HSPG) (ITOH; ORNITZ, 2011; ORNITZ; ITOH, 2001; SCHLESSINGER, 2000).

Estudos sobre a interação de FGF a seus receptores são classicamente descritos em células hepáticas de hamsters, sendo descritos sítios de ligação com maior afinidade (os FGFRs) e sítios com menor afinidade

(GAGs) (NEUFELD; GOSPODAROWICZ, 1985). Inicialmente, a descrição da interação com FGF a seus receptores de baixa afinidade eram citadas como reguladores, porém, estudos mais recentes demonstram sua essencialidade para a manutenção da atividade na regulação da ligação de FGF a FGFR (GIVOL; YAYON, 1992; MOHAMMADI; OLSEN; GOETZ, 2005; MOSCATELLI, 1987; NEUFELD; GOSPODAROWICZ, 1985).

Inicialmente utilizando cromatografia, o estudo da estrutura destes receptores celulares foi descrita como composta por um domínio intracelular com atividade tirosina quinase, uma hélice transmembrana e uma porção extracelular. A porção extracelular é dividida em três domínios *ig-like*: D1, D2 e D3, estes por sua vez são responsáveis pela afinidade de FGFs por seus receptores devido a seus domínios com resíduos ácidos nos ligantes de D1 e D2 denominado *acid Box* e uma região conservada e carregada positivamente em D2 que auxilia a ligação de HSPD em seu sítio de ligação. Enquanto o domínio D3, por sua vez é responsável pela formação de isoformas b e c de FGFR através de *splicing* alternativo (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005; GIVOL; YAYON, 1992; ORNITZ; ITOH, 2001; SCHLESSINGER, 2000; SPIVAK-KROIZMAN; et al, 1994). O *splicing* alternativo dos FGFs permite a grande variedade de isoformas de receptores de FGF. Estas isoformas apresentam variedade estrutural na região D3, que afeta diretamente sua especificidade com o ligante. O *splicing* alternativo de D3 ocorre em FGFR1, FGFR2 e FGFR3 (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005; ZHANG, X. et al, 2006).

A interação de FGF ligado ao FGFR desencadeia respostas fisiológicas através da ativação e fosforilação de proteínas da família FRS2, estas, uma vez ativadas executam funções anteriormente latentes. Com esta ativação, rotas bioquímicas são acionadas, onde a principal via conhecida para FGFs é preferencialmente a via ERK 1/2. A ativação desta via está diretamente relacionada a ativação e desenvolvimento oocitário, sendo necessária para o rompimento da vesícula germinativa (LONERGAN et al, 1996). Em processos reprodutivos, não se está totalmente esclarecido o papel fisiológico de FGFs, tal como sua vias alternativas de ativação (JIANG et al, 2013).

Dentre os processos regulados na reprodução por FGFs, podemos citar a maturação oocitária e expansão das células do cúmulus (HARRIS; HUANG; OBACK, 2013; POMINI PINTO et al, 2014; ZHANG, K.; HANSEN; EALY, 2010), além da relação destas células com as células do folículo ovariano (ALMEIDA et al, 2015; BURATINI et al, 2005; CHAVES et al, 2012). Recentemente, foi apontada a interação de FGFs a

seus receptores como componentes cruciais para a competência oocitária, sendo relatado o aumento da expressão de FGFR nas células do cúmulus nos momentos finais da maturação do oócito (ZHANG, K.; EALY, 2012). Além disso, são mediadores do processo da oogênese e regulação oocitária (SANCHEZ et al, 2009; SUGIURA et al, 2007).

Em camundongos, FGF8 é expresso pelos oócitos, no entanto, em bovinos a expressão é detectada tanto em oócitos quanto nas células da teca e granulosa (BURATINI et al, 2005). Estudos em camundongos mostram que na presença de BMP15, o FGF8 é capaz de estimular a glicólise das células do cúmulus promovendo o mecanismo de expansão destas células (SUGIURA et al, 2007). A sinergia de BMP15 com FGF10 também é responsável no processo de expansão das células do cúmulus, regulando genes importantes para fisiologia celular destas, tais como AREG, ERG, ADAM e HAS2 (CAIXETA et al, 2013). Pomini-Pinto (2014) descreve que, durante a maturação *in vitro* de oócitos, FGF10 suplementado ao meio promoveu o aumento da expansão das células do cúmulus e maturação do oócitos, tal como redução na taxa de apoptose destas células através do aumento da expressão de COX2. Estudos realizados em caprinos apresentaram efeitos benéficos ao cultivarem tecidos ovarianos *in vitro* com FSH adicionado de FGF10, o qual manteve a viabilidade folicular, apresentando maiores diâmetros foliculares e oocitários em relação ao grupo controle (ALMEIDA et al, 2015).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa revelaram um papel fisiológico mediado por FGF18 em Folículos ovarianos em bovinos (PORTELA et al, 2010), entretanto, seu mecanismo ainda não está amplamente elucidado.

1.3.1. FGF18

Inicialmente descrito em 1998, FGF18 é um membro dos fatores de crescimento fibroblásticos que está envolvido em processos fisiológicos celulares, atuando como morfógeno em embriões e um regulador de sistemas em animais adultos. A estrutura de FGF18 é composta por dois sítios de ligação N-glicosídica, caracterizando-o como uma glicoproteína (CORMIER et al, 2005; HAQUE; NAKADA; HAMDY, 2007). Esta molécula apresenta maior similaridade a FGF8 entre os outros FGFS. FGF18 está contido na subfamília do FGF8 é composta pelos FGF8, FGF17 e FGF18, sendo estes pertencentes ao grupo canônico e conhecidos como “família oncogênica fetal”. A família FGF8 está envolvida em diversos processos fisiológicos celulares, como a formação da notocorda em em-

briões de Ascídias (YASUO; HUDSON, 2007), formação de folhetos germinativos e sua diferenciação (CORMIER et al, 2005; MARUOKA et al, 1998), condrogênese e osteogênese (REINHOLD et al, 2004). A similaridade dos membros desta família se dá por sua estrutura e afinidade de receptores, os FGFR3c e FGFR4, os quais se ligam com maior afinidade e FGFR2c, o qual se ligam com menor afinidade (ITOH; ORNITZ, 2004; ORNITZ; ITOH, 2001; ZHANG, K.; HANSEN; EALY, 2010).

Em embriões, a ligação de FGF18 a seus receptores ativa diferentes órgãos e sistemas, como o fígado e intestino delgado, estimulando a atividade mitótica destes tecidos em modelos murinos (HU et al, 1998), formação e proliferação tecidual no sistema nervoso, especialmente as regiões do Telencéfalo, mesencéfalo, gânglio trigeminal e nas raízes do gânglio dorsal (FORD-PERRISS; ABUD; MURPHY, 2001). Estudos realizados em modelos de camundongo apontam o papel essencial de FGF18 no processo condrogênico e osteogênico (LIU et al, 2002; OHBAYASHI, 1998), sendo expresso no pericôndrio e articulações de ossos longos durante a ossificação endocondral (NAGAYAMA et al, 2013; OHBAYASHI et al, 2002). Ratos com redução da expressão de FGF18 apresentaram falhas no desenvolvimento craniofacial. O mesmo estudo revelou a influência de positiva FGF18 sobre a formação de ossos longos e calotas cranianas, além do papel regulatório da proliferação e maturação de osteoblastos e bloqueando a proliferação de condroblastos (OHBAYASHI et al, 2002). A ausência de FGF18 durante o desenvolvimento embrionário e fetal mostra-se incompatível com a vida, comprovados através de estudos em camundongos *knock out* para o gene. Estes morreram pouco tempo após seu nascimento, onde apresentaram incompleto desenvolvimento das fíbula e costelas, malformações no sistema nervoso e intestinos (HAQUE; NAKADA; HAMDY, 2007; LIU et al, 2002; MARUOKA et al, 1998).

Em adultos, FGF18 apresenta atividade homeostática, controlando atividades mitóticas, diferenciação celular e migratórias em diversos órgãos, como testículos, bexiga, músculo estriado esquelético e cardíaco e cérebro (COTTON; O'BRYAN; HINTON, 2008). FGF18 possui efeito protetor em cartilagens articulares em ratos adultos, sendo este altamente expresso por condrócitos maduros, apresentando fatores regenerativos, sendo estudada aplicações clínicas desta molécula (MORI et al, 2014). Clinicamente, FGF18 está sendo utilizado como prognóstico para alguns tipos de cânceres, tais como o Ovariano e colorretais, sendo estudado ainda os mecanismos estimulatórios nesses tumores (KONECZNY et al, 2014; SONVILLA et al, 2010; SONVILLA et al, 2008; WEI et al, 2013).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma particularidade entre a ação do FGF18 na fisiologia ovariana. Em bovinos, FGF18 é altamente expresso em células da granulosa e não é detectado em oócitos, diferente de FGF8 e FGF17, sendo detectado em oócitos de camundongos. Além disso, seu RNAm foi detectado em células da teca cultivadas *in vitro*, porém, não foi detectado em células da granulosa cultivadas em condições similares, sugerindo que a maior fonte de FGF18 folicular sejam as células da Teca. Isto sugere que FGF18 possa estar relacionado diretamente a atresia folicular por ter sido detectado em CG de folículos atréticos (PORTELA et al, 2010). No entanto, apesar dos variados estudos a cerca da sua ação em diferentes momentos da organogênese, morfogênese e em processos fisiológicos, não existem registros na literatura a respeito de sua ação sobre o desenvolvimento embrionário, expansão das células do cúmulus e maturação oocitária.

Diferentes genes são envolvidos nos processos da formação do blastocisto (WATSON et al, 1999), sendo descrita a relação de diferentes FGFs promovendo a expressão de genes relacionados a viabilidade, saúde e morfologia de blastocistos em diferentes espécies (YANG, Q. E. et al, 2011; ZHANG, K.; HANSEN; EALY, 2010; ZHONG et al, 2006). Portela et al (2010) descrevem a variação na expressão gênica de GC quanto submetidas a tratamento com FGF18, no entanto, não se conhece a ação de FGF18 durante o processo de desenvolvimento blastocístico.

2. HIPÓTESE

A presença de FGF18 está envolvido com os processos de expansão de Células do Cúmulus e maturação do Oócitos, afetando a produção *in vitro* de embriões bovinos através da modulação de genes chave para manutenção da viabilidade celular neste sistema.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Ampliar o entendimento dos mecanismos reguladores da expansão das células do cúmulus, maturação nuclear de oócitos bovinos e desenvolvimento embrionário na presença de FGF18, gerando conhecimento para aplicação em pesquisas básicas e geração de processos, visando o aumento da fertilidade e dos índices de produtividade.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar possíveis efeitos do FGF18 sobre a expansão das células do cúmulus e da retomada da meiose em oócitos bovinos submetidos ao tratamento.
- Investigar o processo de maturação oocitária na presença do FGF18.
- Analisar o efeito de FGF18 sobre o processo de produção *in vitro* de embriões e avaliar sua influência sobre o desenvolvimento de blastocistos.
- Avaliar a expressão de genes candidatos para o controle do desenvolvimento embrionário inicial, expansão das células do cúmulus e retomada da meiose de oócitos bovinos submetidos a tratamento com FGF18.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os produtos químicos utilizados foram adquiridos da companhia Sigma Chemicals St. Louis, MO, EUA, salvo indicações em contrário no texto.

4.1. Coleta e maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Ovários de bovinos foram obtidos em frigorífico e transportados ao laboratório em solução de NaCl 0,9% a 30°C contendo penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos entre 3 e 8 mm de diâmetro utilizando uma bomba de vácuo (fluxo de aspiração de 20 ml/minuto). Apenas oócitos de qualidade 1 e 2 foram utilizados para os experimentos (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Os CCOs foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc®) contendo 200 µl de meio de maturação básico para experimentos de expansão das células do cumulus e 400 µl de meio de maturação básico nos experimentos de maturação oocitária e produção de embriões. O cultivo *in vitro* foi realizado em uma incubadora com umidade saturada e atmosfera com 5% de CO₂ a 39°C. O tempo de cultivo foi variado de acordo com o delineamento experimental utilizado. O meio de maturação básico consistiu em TCM 199 contendo com sais de Earle e L-glutamina com 25 mM de Hepes, 0,2 mM de ácido pirúvico, 2,2 mg/ml de bicarbonato de sódio, 100 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina e 0,4% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA). Nos experimentos com o objetivo avaliar a maturação nuclear dos oócitos e a expansão das células do cumulus, o FSH foi adicionado ao meio de maturação básico de acordo com o delineamento experimental utilizado.

4.2. Fertilização e Cultivo de embriões

Após a maturação *in vitro* os CCOs foram transferidos para 400 µl de meio TALP-FERT contendo 30 µg/mL de heparina, 30 µg/mL de penicilinamina, 15 µM de hypotaurina e 1 µM de epinefrina (PARRISH et al, 1988). Os espermatozoides foram selecionados através de um gradiente descontínuo de percoll (45% e 90%) descrito por Parrish et al. (1986) e diluídos em uma concentração final de 2x10⁶/ml. Os CCOs e os espermatozoides foram co-incubados em estufa por 18 h nas mesmas condições atmosféricas descritas para maturação. Após a co-incubação dos gametas,

as células do cumulus foram removidas por agitação mecânica (vórtex) durante 3 minutos. Os prováveis zigotos foram transferidos para o meio SOFaaci descrito por (HOLM et al, 1998), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,2 mM de L-glutamina, 5 µl/ml de aminoácidos não essenciais 100x, 45 µl/ml de aminoácidos essenciais 50x, 2,77 mM myo-inositol, 0,34 mM tri-sódio-citrato e 50 µg/ml gentamicina. O cultivo será realizado a 39°C em uma incubadora com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Os blastocistos foram classificados como Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx) e Blastocisto Eclodido (Be).

4.3. Avaliação da maturação nuclear

Logo após o término do período de maturação *in vitro* as células do cumulus foram removidas por agitação mecânica (vórtex) durante 5 minutos. Os oócitos desnudos foram lavados em PBS contendo 0,1% de álcool polivinílico (PVA) e fixados durante 15-20 minutos em 4% de paraformaldeído. Após a fixação os oócitos foram lavados em PBS contendo 0,1% de PVA e mantidos a 4°C, por não mais do que uma semana, em uma solução de PBS contendo 0,1% de Triton x-100 e 0,3% de BSA. Dois a três oócitos serão incubados por 15 minutos em 10 µl de glicerol contendo 10 µM de Hoechst 33342. Os oócitos foram colocados entre lamina e lamínula e o estágio de maturação nuclear será avaliado em microscópio de epifluorescência. A maturação nuclear foi classificada nos seguintes estágios: vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI), anáfase (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII). Foram considerados como maturados os oócitos que atingiram o estágio de metáfase II e imaturos os oócitos que permaneceram no estágio de vesícula germinativa.

4.4. Avaliação da expansão das células do cumulus

Após o período de cultivo, o grau de expansão das células do cumulus dos CCOs foi avaliado em um microscópio invertido. A expansão das células do cumulus foi mensurada com o software Micrometric SE. Foram avaliadas a área e perímetro das células de cúmulus as 0h, 12 h, 18 h e 24h após o período de incubação, conforme descrito previamente (ZHANG, X. et al, 2010)

4.5. Estudos de expressão gênica

Após cultivo, o RNA total foi extraído das células do CCO pelo método do Trizol de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada com espectrofotômetro NanoDrop em um comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi verificada eletroforeticamente por coloração com brometo de etídio e a pureza, através da taxa de absorção da relação OD260/OD280 onde não foram utilizados valores inferiores a 1,8.

O RNA total (500 ng) foi tratado com gDNA Wipeout Buffer (Qiagen) a 42°C por 2 minutos para digerir qualquer DNA contaminante. A reação de transcriptase reversa foi realizada utilizando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) conforme as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real usando Platinum SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems) e a variabilidade na quantidade RNAm foram corrigida pela amplificação do gene de referência histona H2A (BARRETA et al., 2012). O cálculo da expressão relativa foi realizado conforme preconizado por Pfaffl (2001). Os iniciadores específicos estão listados na Tabela 1.

Tabela1: Sequência dos genes avaliados. A: sequência Antissenso; S: sequência senso; 1 (Bettegowda et al, 2006), 2 (Portela et al, 2010); 3 (Barreta et al, 2012); 4 (Portela et al, 2015); 5 (Hirayama et al, 2014); 6 (El-Sayed et al 2006).

Gene	Sequência	Conc (nM)	Ref
Histone H2A	A TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC S GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	200	1
GADD45B	A GTCCTCCTCTTCTCCGTCGAT S TACGAGTCGGCCAAGCTGAT	200	2
53BP1	A CACCACGTCAAACACCCCTAA S ATCAGACCAACAGCAGAATTTCC	200	3
RAD52	A TGACCTCAGATAGTCTTTGTCCAGAA S GGCCAGGAAGGAGGCAGTA	200	3
FasL	A TGCCTGTAAATGAGCTGCTTTT S AGCCAAAGGCATACAGCATCA	200	4
Interferon-tau	A TGTTGGAGCCCAGTGCAGA S TCCATGAGATGCTCCAGCAGT	200	5
COX2	A TCCAGAGTGCGAAGAGCTTGCATT S AAGCCTAGCACTTTCGGTGGAGAA 3	200	6

4.6. Análise Estatística

A análise de variância foi realizada com software JMP (SAS Institute) com o tratamento como principal efeito e replica como uma variável aleatória. As diferenças entre as médias foram testadas com o teste TUKEY de comparação múltiplas. A homogeneidade da variância foi testada com testes de O'Brien e Brown Forsythe. Os dados que não seguiram uma distribuição normal foram transformados em logaritmos (Shapiro-Wilk).

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Experimento 1: Avaliação do efeito dose-resposta do FSH sobre a expansão das células do cúmulus

O objetivo deste experimento foi identificar as concentrações ideais de FSH para a viabilização da expansão das células do cúmulus, permitindo então avaliar os efeitos de FGF18 sobre este evento. As doses avaliadas permitiram aferir escores de expansão, classificados em: insuficiente, moderada e Plena. Foram coletados CCOs (n=24 por grupo) provenientes de abatedouro e então cultivados em meios de maturação contendo diferentes concentrações de FSH (Folltropin; Bioniche): 0, 1, 10, 50, 100 e 500 ng/ml. Os CCOs foram analisados as 0h, 12h, 18h e 24h após adicionados ao meio de maturação, sendo registrado por fotos em microscópio invertido a expansão do CCO. Para mensuração da área e perímetro das células, foi utilizado o software Micrometric SE. Esse experimento foi realizado em quadruplicada.

5.2. Experimento 2: efeito do FGF18 sobre a expansão das células do cumulus

Este experimento propôs investigar o efeito do FGF18 sobre a expansão das células do cúmulus de oócitos bovinos. Para isso, avaliamos o efeito dose-resposta do FGF18 associado ou não a concentrações de FSH capazes de induzir a uma plena, moderada ou insuficiente expansão das células do cúmulus. Os CCOs (n=24 por grupo) foram maturados em diferentes concentrações de FSH (0, 50, 100 e 500 ng/ml) e FGF18 (0, 100, 500 e 1000 ng/ml) perfazendo um delineamento 4x4 (16 associações entre FSH e FGF18). As condições de cultivo e fotodocumentação foram as mesmas realizadas para o experimento 1.

5.3. Experimento 3: efeito do FGF18 sobre maturação nuclear do oócito

Este experimento propôs investigar o efeito do FGF18 sobre a maturação nuclear de oócitos bovinos. Após 24h de maturação na ausência ou presença de FGF18, os oócitos (n=24 por grupo) foram desnudos, fixados em paraformaldeído a 4%, mantidos em Triton X-100 a 0,5% e colorados

com Hoechst para avaliação da maturação nuclear em microscópio de epifluorescência. Esse experimento foi realizado em quadruplicada. As condições de cultivo e doses de FSH foram as mesmas descritas para o experimento 1.

5.4. Experimento 4: influência de FGF18 sobre a maturação *in vitro* de CCOs bovinos

Este ensaio visou avaliar possíveis efeitos de FGF18 adicionados ao meio de maturação dos CCOs, sendo testada a hipótese de que o FGF18 é capaz de inibir a expansão das células do cumulus induzidas pelo FSH. Para isso, complexos cumulus-oócito de bovinos (n=30/grupo) foram cultivados em meio de maturação básico suplementado com diferentes concentrações de FGF18 (100, 500 e 1000 ng/ml; PORTELA et al., 2010) e FSH (500 ng/ml, definido pelo experimento 1). Foram utilizados como controle positivo CCOs cultivados em meio de maturação básico suplementado com FSH (500 ng/ml) e como controle negativo CCOs cultivados em meio de maturação básico na ausência de tratamentos (sem FSH e FGF18; nesse grupo as células do cumulus não terão expansão conforme descrito por LONERGAN et al., 1996). Os CCOs foram retirados do cultivo após 24 h para avaliação da expansão das células do cumulus conforme previamente descrito. O experimento foi realizado em quadruplicada.

5.5. Experimento 5: efeito do FGF18 sobre o desenvolvimento embrionário

Este experimento foi proposto para investigar a ação de FGF18 sobre a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos e zigotos. Para este experimento foram delineados três grupos (n=50/grupo). Grupo 1 - 100 ng/ml de FGF18 foram adicionadas ao meio de maturação, no intuito de identificar se a presença de FGF18 durante a MIV afeta a capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos. Neste grupo, após o período de maturação, os oócitos foram fertilizados e cultivados na ausência de FGF18. Grupo 2 – Neste a maturação e fertilização foram realizadas na ausência de FGF18, porém, durante o cultivo 100 ng/ml de FGF18 foram adicionadas ao meio de desenvolvimento embrionário. O grupo 3 (controle) foi maturado, fertilizado e cultivado na ausência de FGF18. As taxas de clivagem e blastocisto, avaliadas respectivamente nos

dias 2 e 7 pós-fertilização, foram calculadas sobre o total de oócitos em cada grupo. Esse experimento foi realizado em quadruplicada.

Após a avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário no dia 7, os blastocistos produzidos em cada grupo foram lavados em PBS e acondicionados em microtubos de centrífuga contendo 200 μ l de trizol e armazenados em freezer -80°C até a extração do RNA total. Este RNA foi utilizado para avaliar a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário participando de eventos relacionados ao reparo de DNA (RAD52 e 53bp1), proliferação celular (GAD45D), reconhecimento materno da gestação (Interferon-tau) e eclosão (COX-2).

5.6. Experimento 6: Avaliação da expressão gênica

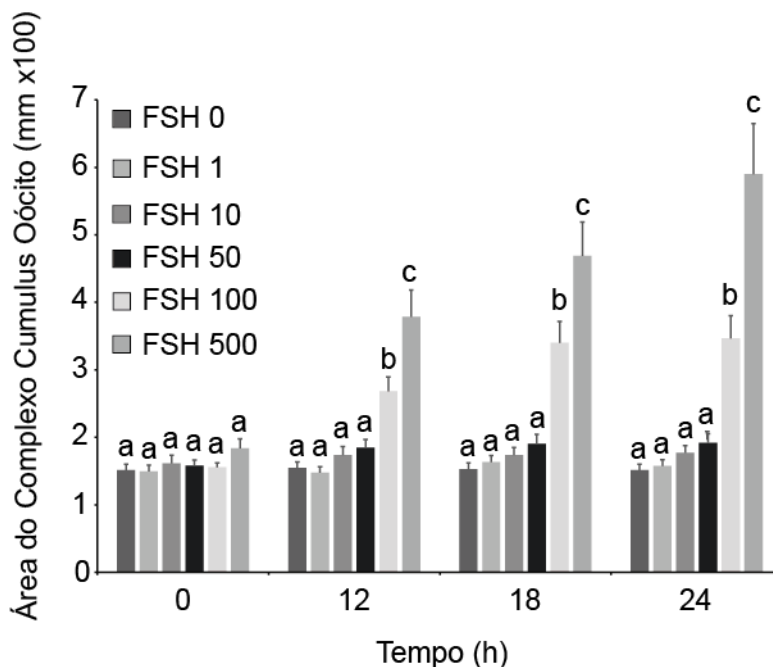
As análises de expressão relativa dos genes foram realizadas conforme previamente descrito. Após findado o período sete dias de cultivo dos zigotos, apenas os blastocistos foram coletados para análise molecular. Em cada grupo, os blastocistos foram lavados em PBS contendo 0,1% de PVA em seguida transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 200 μ l de trizol e estocados a -80°C , permanecendo nesta condição até o momento da extração do RNA.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1: Avaliação do efeito dose-resposta do FSH sobre a expansão das células do cúmulus

Como demonstrado na figura 1, os CCOs tratados com doses inferiores a 100ng/ml não surtiram diferença estatística em sua expansão. CCOs tratados com 100 e 500 ng/ml de FSH apresentaram expansão. A área dos CCOs tratados com 500 ng/ml de FSH se demonstraram mais eficazes para a expansão dos CCOs.

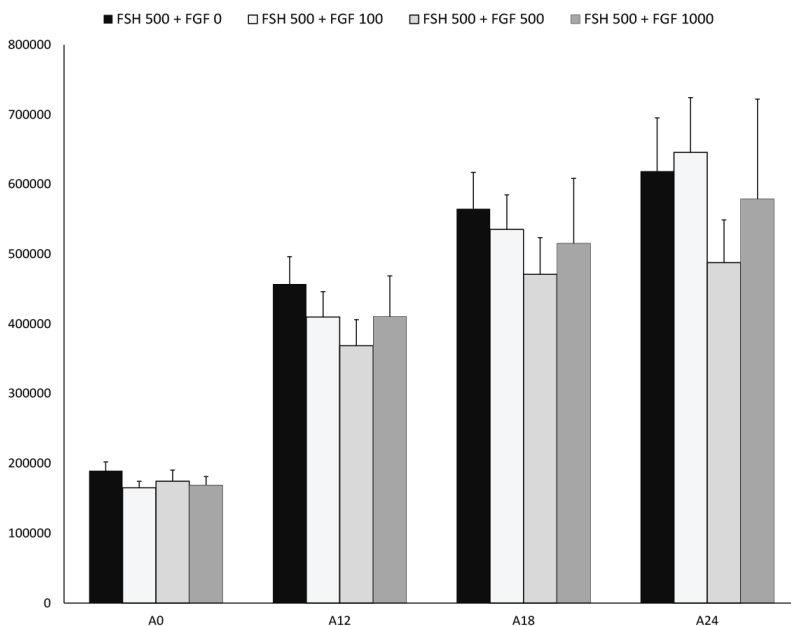
Figura 1: Efeito de diferentes doses de FSH (0, 1, 10, 50, 100 e 500 ng/ml) na expansão de CCOs após 0h, 12h, 18h e 24h de maturação *in vitro*. Foram realizadas quatro replicatas com 24 CCOs por grupo, totalizando 576 CCOs no experimento. Letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. ($P < 0,05$).



6.2. Experimento 2: efeito do FGF18 sobre a expansão das células do cumulus

Durante a realização das avaliações, observou-se que apenas a dose de FSH 500 ng/ml surtiu efeito na expansão do cúmulus (expansão plena). Doses inferiores não foram capazes de promover expansão plena (não demonstradas). Não houve divergência na taxa de expansão das células do cúmulus nos horários observados, mesmo quando acrescidas de FGF18.

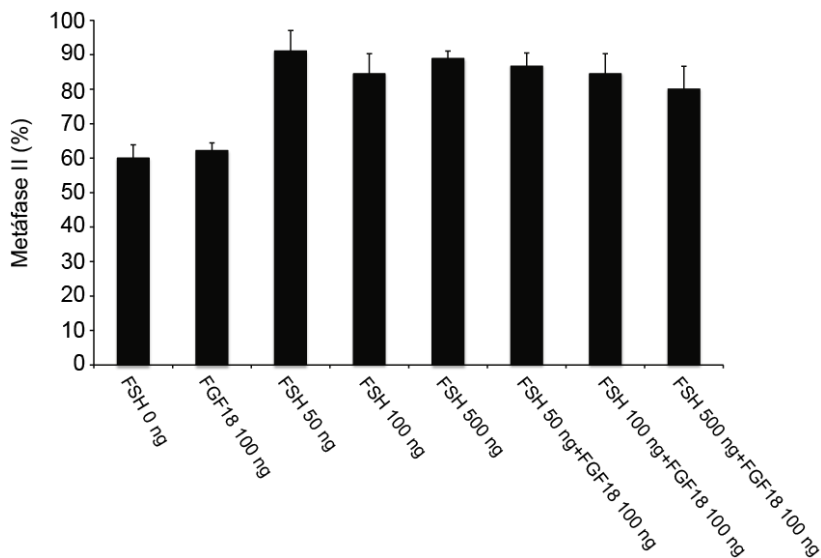
Figura 2: Efeito de diferentes doses de FGF18 (0, 100, 500 e 1000 ng/ml) na expansão das células do cumulus após 0h, 12h, 18h e 24h de diferentes concentrações de FSH (apenas 500 ng/ml é ilustrado). As células foram observadas e fotodocumentadas durante o período de maturação. Foram realizadas quatro replicatas. A (horário) + hora de observação após maturação (0, 12, 18 e 24h) ($p < 0,05$). Valores representam área expandida em mm². Foram realizadas quatro repetições para este experimento (n=12 por grupo).



6.3. Experimento 3: efeito do FGF18 sobre a maturação nuclear do oócito

Após as 24h de maturação, os oócitos foram avaliados e identificados que em todos os grupos apresentaram taxas superiores a 60% de oócitos em Metáfase II (MII) (Figura 3). A porcentagem de células em MII não divergiu entre os grupos tratados com FSH, mesmo quando acrescidos de FGF18, estes grupos apresentaram maiores taxas de oócitos em MII em relação aos grupos com ausência de FSH. Os grupos avaliados na ausência de FSH acrescido ou não de FGF18 apresentaram menores taxas de oócitos em MII. Foram realizadas quatro repetições para este experimento.

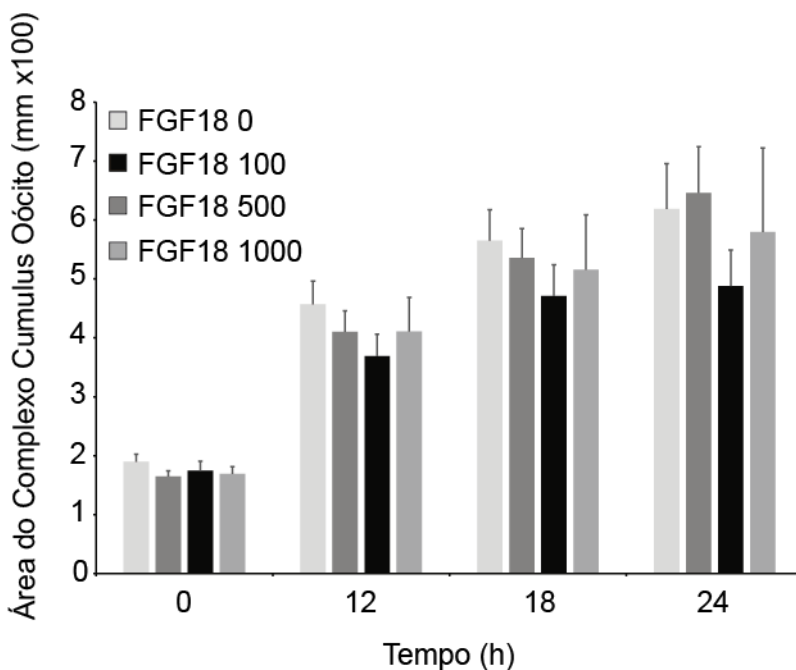
Figura 3: Gráfico representando em porcentagem a taxa de oócitos que atingiram a metáfase II após 24h de tratamento sobre diferentes concentrações de FSH (0, 50, 100 e 500 ng/ml) e FGF (100ng/ml). As células foram observadas após 24h de maturação e coradas com Hoescht – 33342. Foram realizadas quatro replicatas, (n=24 por grupo). Letras diferentes representam diferenças entre os grupos ($p<0,05$).



6.4. Experimento 4: efeito do FGF18 sobre a expansão das células do cúmulus

Os grupos tratados na presença e ausência de FGF18 apresentaram expansão dos CCOs, não demonstrando diferença estatística significativa em todos os horários analisados (Figura 4). Foram utilizados 30 CCOs por grupo e realizadas quatro replicações, totalizando em 480 CCOs neste experimento.

Figura 4: Efeito de diferentes doses de FGF18 (0, 100, 500 e 1000 ng/ml) na expansão das células do cumulus após 0h, 12h, 18h e 24h de tratamento. Foram realizadas quatro replicações com 30 CCOs por grupo, totalizando 480 CCOs no experimento. ($P < 0,05$).



6.5. Experimento 5: efeito do FGF18 sobre o desenvolvimento embrionário

Neste experimento foi demonstrado que FGF18 reduziu as taxas de blastocistos no grupo tratado durante a etapa de cultivo. Não houve diferença entre a taxa de clivagem dos grupos avaliados. Ao avaliarmos embriões que atingiram estágios de blastocistos, o grupo FGF-MIV não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, demonstradas na figura 5. A presença de FGF18 no grupo FGF18 CIV resultou em menores taxas de embriões em relação ao grupo controle e ao grupo FGF-MIV (figura 5). Os embriões provenientes dos grupos acrescidos de FGF18 possuíam blastocistos em estágios de desenvolvimento mais inicial em relação ao grupo controle (figura 6). Blastocistos em estágio Bi foram encontrados em todos os grupos sem diferença estatística. Blastocistos B1 foram encontrados em maiores taxas no grupo controle, já os grupos tratados com FGF18 apresentaram porcentagens inferiores e similares entre si. Blastocistos expandidos estavam em maior taxa no grupo controle, enquanto que o grupo FGF18 MIV demonstrou um menor número de blastocistos, porém, superior ao grupo tratado na etapa de CIV. O tratamento com FGF18 reduz a taxa de embriões além de retardar o estágio de desenvolvimento.

Figura 5: Taxa de clivagem (A) e porcentagem de Blastocistos produzidos *in vitro* (B) em meio suplementado de FGF18. Letras demonstram a diferença entre os grupos ($P < 0,05$).

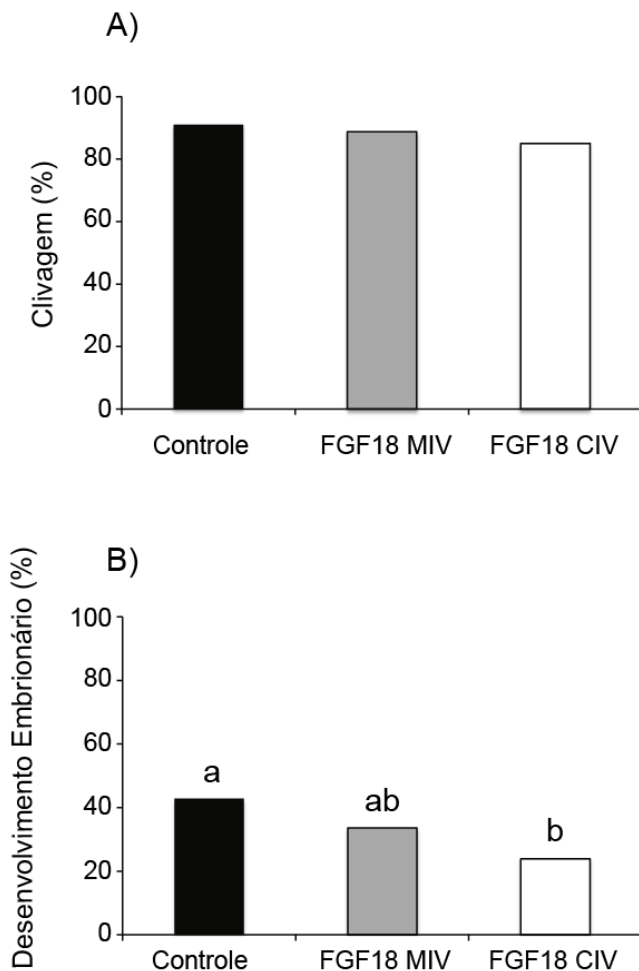
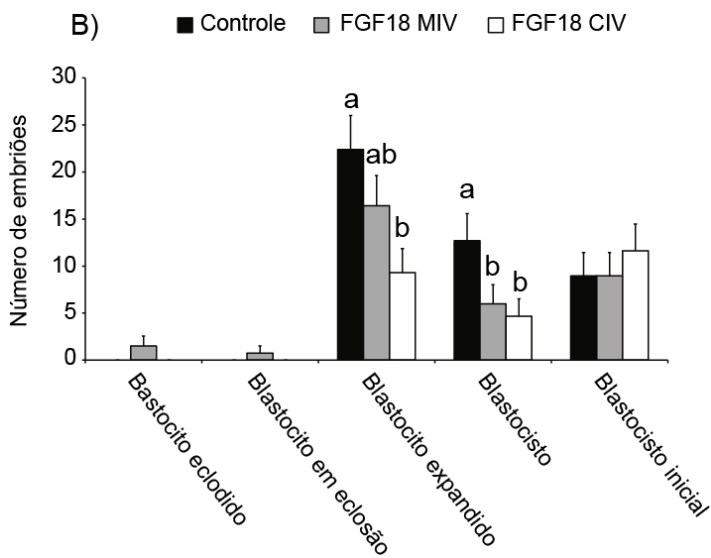


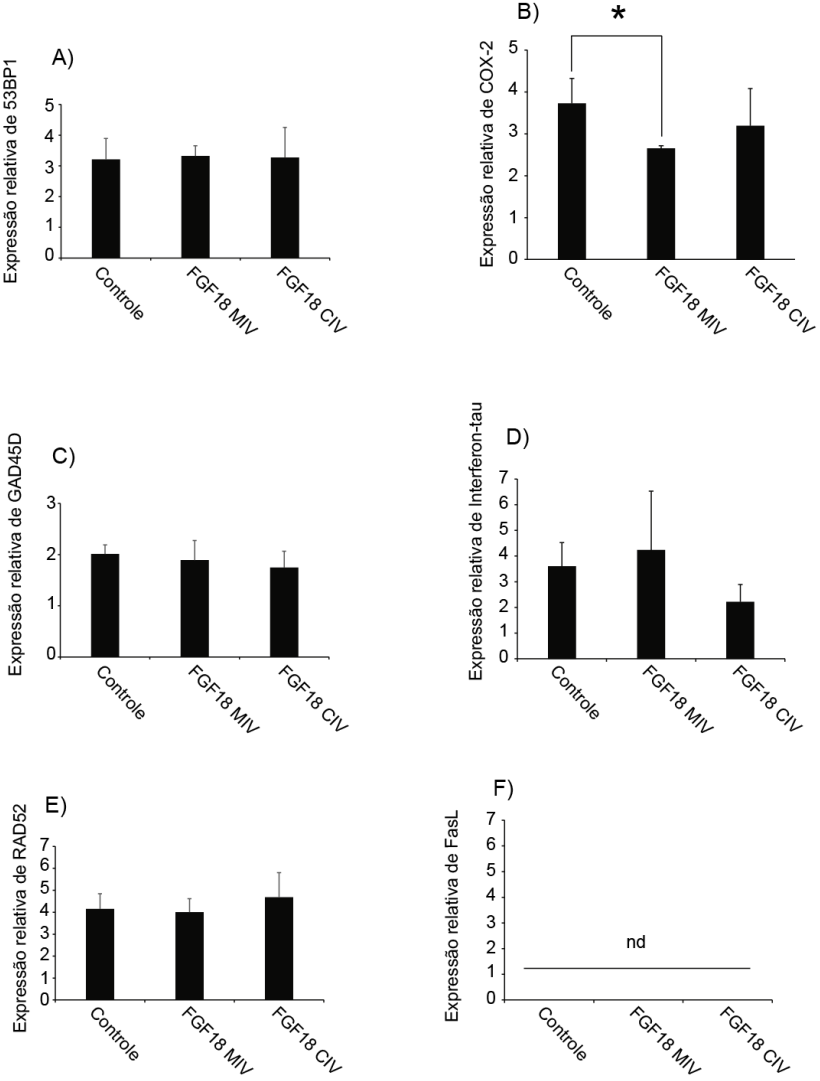
Figura 6: Número de Blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento produzidos *in vitro* na presença ou não de FGF18. Letras demonstram a diferença entre os grupos. ($P < 0,05$).



6.6. Experimento 6: Efeito de FGF18 sobre a expressão gênica de embriões produzidos *in vitro*

A expressão relativa dos genes avaliados em blastocistos tratados durante a maturação não apresentou variação em relação ao controle, exceto por COX2 (figura 7). Blastocistos obtidos por tratamento suplementado de FGF18 durante a CIV não apresentaram variação na expressão gênica relativa dos genes avaliados.

Figura 7: Expressão relativa dos genes 53BP1, COX2, GADD45B, Inteferon-Tau, RAD52 e FasL durante a produção *in vitro* de embriões na ausência de tratamento suplementado com FGF18 (Controle); Blastocistos tratados durante a Maturação *in vitro* dos CCOs (FGF18 MIV); Blastocistos tratados durante o *Cultivo in vitro* dos zigotos (FGF18 CIV). nd (sem expressão). * representa a diferença estatística entre os tratamentos ($P<0,05$). Dados obtidos após quatro replicações do experimento. Dados expressos como média.



7. DISCUSSÃO

Nossos resultados revelam que a suplementação de FGF18 ao meio de cultivo reduz a taxa de blastocistos (figura 5-B), tal como provoca retardo nos estágios de desenvolvimento dos blastocistos (figura 6), quando comparados ao controle. Inicialmente, a cinética das clivagens dos zigotos foi avaliada após 24h de cultivo *in vitro*. Nossos dados indicam que a suplementação de FGF18 durante a MIV e durante a CIV não influenciou na taxa de clivagem das células analisadas (figura 5-A). Poucos estudos foram realizados em análises dos efeitos de FGFs sobre a clivagem de zigotos. Zhang et al (2010) avaliaram em condições *in vitro* a ação de FGF10 durante a etapa de maturação dos CCOs, resultando em uma maior expansão, maior taxa de clivagem e de blastocistos produzidos. Resultado similar, entretanto sem obtenção de melhores taxas de blastocistos foi relatado por Pomini Pinto et al (2014) após a suplementação de FGF10 a MIV. Nosso grupo de pesquisa apresenta este estudo como o pioneiro em literatura a avaliar FGF18 sobre as clivagens iniciais de zigotos. Além do retardo em clivagens iniciais, FGF18 resultou em atrasos de desenvolvimento de blastocistos no presente estudo, como posteriormente exposto. O atraso neste desenvolvimento pode estar atrelado diretamente a fatores inibitórios de clivagem. Logo, se sugere avaliar a expressão gênica de genes envolvidos com a formação de fusos mitóticos e indutores de divisão celular, tanto em clivagens iniciais de zigotos jovens como em zigotos mais desenvolvidos.

Com as análises das clivagens realizadas, os embriões foram avaliados após o período de incubação. Feita as análises morfológicas e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento, os dados obtidos revelaram que FGF18 afetou de modo significativo os indivíduos tratados durante o cultivo *in vitro*. As células cultivadas sobre estas condições apresentaram uma inferior quantidade de blastocistos em relação ao grupo controle. Não obstante, os blastocistos apresentaram maior taxa de embriões em estágio de desenvolvimento mais inicial em relação aos grupos controle. Este é o primeiro relato de literatura que relaciona FGF18 a um efeito fisiológico negativo nas etapas do desenvolvimento embrionário de blastocistos. O primeiro dado envolvendo FGF18 à um efeito pro apoptótico foi também descrito por nosso grupo de pesquisa (PORTELA et al, 2010) ao cultivar *in vitro* células da granulosa suplementadas com FGF18 em seu meio de cultura. Somados estes dados, podemos propor que FGF18 é um fator com ação embriotóxica durante o desenvolvimento de blastocistos, retardando seu desenvolvimento. Uma possível explicação

para este fato seja o maior tempo de exposição de zigotos em desenvolvimento durante a etapa de cultivo, resultando em retardo no desenvolvimento embrionário. A partir dos efeitos morfológicos relatados, se faz necessário uma maior avaliação de genes envolvidos com o desenvolvimento embrionário.

Apesar de não apresentar diferença estatística, o grupo tratado durante a maturação *in vitro* apresentou leve tendência a uma inferior quantidade de blastocistos em relação ao grupo controle. Este dado pode ser justificado devido a presença de FGF18 em contato tanto com oócitos quanto com células do cúmulus, interferindo na comunicação e fisiologia individual de ambas. Para verificar esta relação, maiores estudos de expressão gênica são requeridos.

Com as análises morfológicas dos embriões obtidas, foi então avaliada a expressão relativa de RNAm para genes que participam dos eventos de reparo de DNA (GADD45B, RAD52 e 53BP1), indutores de morte celular (FasL) e regulatórios do desenvolvimento embrionário (COX2 e Interferon-tau) (figura 7). Foi observado que os todos os genes foram expressos em embriões bovinos no após o período de cultivo, exceto FasL (figura 7-F). Porém, COX2 foi o único gene em estudo que apresentou variação na expressão após avaliação em D7, sendo observada redução em sua expressão (figura 7-B). Este efeito foi observado apenas em embriões tratados no decorrer da etapa de maturação *in vitro* durante o estágio de oócito. COX2 está envolvido diretamente com o alongamento, formação de MEC e implantação do blastocisto bovino (GOMEZ et al, 2009; GOOVAERTS et al, 2011). A baixa expressão de COX2 em blastocistos resultou em uma menor taxa de implantação e prenhez. Blastocistos com maior expressão de COX2 apresentaram menores taxas de absorção, apoptose e viabilidade celular (EL-SAYED et al, 2006; PAKRASI; JAIN, 2008). Estes achados indicam que a redução na expressão de COX2 são indicadores de baixa viabilidade de desenvolvimento embrionário, sendo este gene essencial para a ideal formação do blastocisto. Nosso resultado então nos leva a concluir que a redução na expressão de RNAm para COX2 detectada nos Blastocistos tratados durante a maturação foi induzida pela presença de FGF18 ao meio que CCOs se encontravam, entretanto, este evento ainda não está bem elucidado. Para melhor compreensão deste episódio, estudos de expressão gênica de COX2 devem ser realizados durante MIV dos CCOs. Uma alternativa para este experimento seria avaliar a expressão gênica de COX2 durante a etapa de maturação *in vitro* de CCOs em diferentes períodos de tempo. COX2 é expresso tanto em oócitos quanto em células do cúmulus (MAREI et al, 2014; POMINI PINTO et al, 2014), com isso, se faz necessário identificar se FGF18 atua

regulando negativamente COX2 em oócitos, células do cúmulus ou em ambos. A partir deste princípio, deve ser avaliado o momento preciso da variação na expressão de COX2 em diferentes períodos de tempo. Os resultados deste experimento auxiliarão então a compreender os mecanismos por trás do efeito negativo de FGF18 sobre o desenvolvimento embrionário.

Diferente de COX2, Interferon-tau não variou nos grupos estudados após o período de CIV (figura 7-D). Interferon-tau é um interferon tipo I secretado por embriões de bovinos e ovinos, sendo necessário para o reconhecimento maternal de prenhez. Interferon-tau foi detectado previamente em blastocistos, porém, ausente em mórula, sugerindo um papel na formação da blastocle nestes modelos animais (KUBISCH; JOHNSON, 2007; KUBISCH et al, 2001; MACHADO et al, 2013). A secreção de Interferon-tau é altamente variada entre os blastocistos em cultura, sendo influenciado diretamente pelo estágio de desenvolvimento do embrião, onde indivíduos mais jovens produzem menos Interferon-tau em relação a indivíduos mais derivados (BERTOLINI et al, 2002; HIRAYAMA et al, 2014; KUBISCH et al, 2001). Estes dados colaboram com a utilização de Interferon-tau como um marcador para o desenvolvimento blastocístico. No entanto, nossos dados demonstram que Interferon-tau não apresentou variação na expressão mesmo nos grupos tratados com FGF18 durante o cultivo. Isto nos sugere que FGF18 possivelmente não atue sobre a via de desenvolvimento utilizada por Interferon-tau. Uma possível explicação para este evento seja devido a tardia expressão de Interferon-tau (KUBISCH et al, 2001) em relação a outros genes durante o desenvolvimento embrionário inicial. Como o surgimento da expressão de Interferon-tau só acontece com a formação da blastocle (BERTOLINI et al, 2002), é sugerido então que FGF18 exerça sua ação previamente a ativação deste gene. Para melhor avaliação do efeito de FGF18 sobre os embriões, é sugerido a escolha de novos genes candidatos, preferencialmente ativados no início do desenvolvimento de zigotos e então avaliar sua expressão em diferentes períodos de incubação na etapa de CIV.

As expressões dos genes de resposta a danos no DNA não foram alteradas em nenhum dos grupos analisados após o período de cultivo de blastocistos (figura 7-A –C -E). Este resultado nos leva a considerar que FGF18 não está envolvido diretamente com danos diretos ao DNA, como observado em células da granulosa cultivadas *in vitro* por Portela et al (2010, 2015). Barreta et al (2012) relataram a expressão elevada de RAD52 e 53BP1, ambos envolvidos no reparo de DNA por recombinação homóloga, em embriões submetidos a irradiação ultravioleta, fragmen-

tando seu material genético. Entretanto, no presente estudo, apenas a expressão gênica de blastocistos viáveis foi analisada, logo, uma hipótese para este resultado seja que os blastocistos viáveis submetidos ao FGF18 puderam recuperar possíveis danos causados pela incubação com FGF18, enquanto que os embriões que não conseguiram se desenvolver além do estágio de mórula não foram capazes de driblar o mecanismo molecular de FGF18. Uma possível alternativa para avaliar também o efeito de FGF18 sobre o retardo no desenvolvimento seria avaliar e incubar os embriões nos dias D8 e D9, dando então aos embriões maior tempo para se desenvolver. A fim de avaliar de modo mais preciso a expressão destes genes, se deve futuramente avaliar o desenvolvimento embrionário também dos embriões que não atingiram o estágio de blastocisto, verificando possíveis variações atreladas ao retardo no desenvolvimento. Outra sugestão de experimento seria avaliar em diferentes períodos de tempo durante a etapa de CIV o desenvolvimento de zigotos e mórulas com o intuito de verificar se a expressão de genes de reparo sofre alguma variação com tratamento suplementados de FGF18.

A expressão de RNAm para FasL também foi avaliada, tal como previamente realizado por Portela et al (2010,2015), entretanto, não foram identificados RNAm s de FasL em blastocistos. Não foram identificados em literatura trabalhos envolvendo FasL em desenvolvimento de blastocistos de *Bos taurus*.

Neste presente estudo, foram também realizados ensaios sobre os efeitos da maturação *in vitro* dos CCOs com meio suplementado de FGF18 sobre a expansão das células do cúmulus (figura 4) e maturação nuclear do oócito (figura 3). Os resultados deste experimento revelam que a adição de FGF18 não interferiu nestes referidos processos de modo significativo. O processo de expansão é essencial para o desenvolvimento do oócito e a subsequente fecundação (VAN WAGTENDONK-DE LEEUWA et al, 1999; WIGGLESWORTH et al, 2013; XU; CHAUBAL; DU, 2009; ZHANG, X. et al, 2010). O grau de expansão das células do cúmulus está diretamente ligado com a qualidade de maturação oocitária, sendo demonstrado maiores taxas de clivagens de CCOs com maior grau de expansão do cúmulus (FURNUS; DE MATOS; MOSES, 1998). Logo, um efeito de FGF18 sobre este processo poderia implicar diretamente a viabilidade do oócito, resultando em uma alteração taxa de desenvolvimento embrionário. Nossos resultados revelam que mesmo doses suprafisiológicas de FGF18 não parecem estar envolvidas no processo de expansão em diferentes horários (figura 2; figura 4). Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, o efeito de FGF18 sobre as células da granulosa em cultivo *in vitro* foram pró apoptóticos em relação

ao grupo controle, elevando a expressão de genes em resposta a danos de DNA e reduzindo a expressão de genes chave para a esteroidogênese (PORTELA et al, 2010, 2015). Estes achados nos levaram a esperar efeito semelhante sobre as células do cúmulus. Entretanto, estudos moleculares devem ser realizados para avaliar a influência de FGF18 sobre a fisiologia celular das células do cúmulus.

Tal como as células do cúmulus, FGF18 também não surtiu efeito sobre a maturação nuclear dos oócitos submetidos a diferentes concentrações de FGF18 (figura 3). A maturação nuclear é essencial para o desenvolvimento oocitário, sendo este evento o marco do oócito alcançar a metáfase II (HYTTEL et al, 1997). O não alcance do oócito a esta etapa resulta em uma impossível singamia (BRACKETT, 1985). Com estes dados em mente, identificamos que FGF18 não surte efeito sobre esta etapa, sendo detectado que a maioria dos oócitos analisados se encontravam em meiose II.

Devido a alteração de expressão de COX2 em blastocistos submetidos a tratamento com FGF18 na maturação, é proposto que experimentos moleculares sejam propostos a fim de avaliar efeitos de FGF18 sobre a expansão das células do cúmulus e maturação oocitária. Dados não publicados de nosso grupo de pesquisa revelam que FGF18 eleva a expressão relativa de RNAm para RAD52 às 12h de maturação dos CCOs, sendo estabilizada as 24h a níveis semelhantes ao controle. Este evento nos revela um efeito estressor de FGF18 durante a maturação, podendo este influenciar na redução da expressão de RNAm para COX2 nos blastocistos. Logo, avaliar em diferentes períodos de tempo a expressão gênica de novos genes candidatos é essencial para relatar efeitos no maquinário molecular de células do cúmulus, oócitos e consequentemente aos blastocistos.

Este dados ratificam a ação citotóxica de FGF18 sobre sistemas reprodutivos e demonstram um novo efeito embriotóxico de FGF18 sobre o desenvolvimento de embriões. Tal como dados de Jiang et al (2013) e Portela et al (2010, 2015), as vias de atuação de FGF18 permanecem obscuras. Diferente dos referidos trabalhos, FGF18 não afetou diretamente a expressão de genes em embriões, tais como GADD54B e FasL em células da granulosa. Estas informações nos levam a crer que FGF18 atua sobre diferentes rotas em granulosas e embriões. É sugerido maiores análises moleculares a fim de identificar possíveis genes e rotas que estejam envolvidas com a ligação de FGF18 a seu receptor.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apresentam de modo inédito a ação da embriotoxicidade de FGF18 em sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, divergindo de outros membros da família dos FGFs avaliados até o momento. Através das técnicas de maturação *in vitro*, se pode concluir que FGF18 não afeta de modo significativo a expansão das células do cúmulus e maturação oocitária, não comprometendo a taxa de embriões produzidos. Com o cultivo *in vitro*, foi demonstrado que FGF18 possui efeito fisiológico sobre o desenvolvimento dos zigotos a blastocistos, onde apenas grupos tratados durante a CIV apresentaram menor taxa de blastocistos, tal como retardo em seu desenvolvimento. Entretanto, A expressão gênica relativa para os genes estudados não foi significativamente afetada por FGF18, indicando rotas distintas de atuação citotóxica de FGF18 ao modelo de células da granulosa previamente descrito. As vias de atuação lúgubre de FGF18 ainda permanecem indecifradas.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v. 30, n. 12, p. 1005-15, Dec 2009.

ALMEIDA, A. P. et al. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on in vitro development of goat preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 152, p. 32-8, Jan 2015.

ANTOINE, M. et al. Expression pattern of fibroblast growth factors (fgfs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. **Growth Factors**, v. 23, n. 2, p. 87-95, Jun 2005.

BARRETA, M. H. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos with different developmental competence. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 16, p. 2049-58, Oct 1 2012.

BARRETA, M. H. et al. Evidence that the effect of angiotensin ii on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins e2 and f2alpha. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 733-40, Dec 2008.

BEN-AMI, I. et al. Novel function of ovarian growth factors: Combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. **Mol Hum Reprod**, v. 12, n. 7, p. 413-9, Jul 2006.

BERTOLINI, M. et al. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 63, n. 3, p. 318-28, Nov 2002.

BETTERIDGE, K. J. Equine embryology: An inventory of unanswered questions. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S9-21, Sep 1 2007.

BLONDIN, P. et al. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1061-1075, Apr 1 1997.

BRACKETT, B. G. In vitro oocyte maturation and fertilization. **J Anim Sci**, v. 61 Suppl 3, p. 14-24, 1985.

BURATINI, J., JR. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, n. 3, p. 343-50, Sep 2005.

CAIXETA, E. S. et al. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27-35, Jul 2013.

CHAVES, R. N. et al. The fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis. **Reprod Fertil Dev**, v. 24, n. 7, p. 905-15, 2012.

CHO, J. H. et al. Fibroblast growth factor 7 stimulates in vitro growth of oocytes originating from bovine early antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 12, p. 1736-43, Dec 2008.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **Int J Dev Biol**, v. 56, n. 10-12, p. 799-808, 2012.

CONTI, M. et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 4, p. 715-23, Apr 2006.

CORMIER, S. et al. Expression of fibroblast growth factors 18 and 23 during human embryonic and fetal development. **Gene Expr Patterns**, v. 5, n. 4, p. 569-73, Apr 2005.

COTTON, L. M.; O'BRYAN, M. K.; HINTON, B. T. Cellular signaling by fibroblast growth factors (fgfs) and their receptors (fgfrs) in male reproduction. **Endocr Rev**, v. 29, n. 2, p. 193-216, Apr 2008.

DAVIS, B. J. et al. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin e2 and interleukin-1beta. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2685-95, Jun 1999.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v. 43, n. 7, p. 1211-25, May 1995.

EL-SAYED, A. et al. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, v. 28, n. 1, p. 84-96, Dec 13 2006.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J Anim Sci**, v. 25, n. 3, p. 800-5, Aug 1966.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 139-149, 2005.

FAIR, T.; LONERGAN, P. The role of progesterone in oocyte acquisition of developmental competence. **Reprod Domest Anim**, v. 47 Suppl 4, p. 142-7, Aug 2012.

FAN, H. Y. et al. Mapk3/1 (erk1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 938-41, May 15 2009.

FERNER, K.; MESS, A. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 178, n. 1, p. 39-50, Aug 31 2011.

FORD-PERRISS, M.; ABUD, H.; MURPHY, M. Fibroblast growth factor in the developing central nervous system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 493-503, 2001.

FULOP, C. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, v. 130, n. 10, p. 2253-2261, 2003.

FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; MOSES, D. F. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: Relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 76-83, 1998.

GERSHON, E. et al. Low expression of cox-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in sult1e1-deficient mice. **FASEB J**, v. 21, n. 8, p. 1893-901, Jun 2007.

GIVOL, D.; YAYON, A. Complexity of fgf receptors: Genetic basis for structural diversity and functional specificity. **FASEB**, v. 6, n. 15, p. 3362-3369, 1992.

GOMEZ, E. et al. Gene expression in early expanded parthenogenetic and in vitro fertilized bovine blastocysts. **J Reprod Dev**, v. 55, n. 6, p. 607-14, Dec 2009.

GOOVAERTS, I. G. et al. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1293-303, Oct 15 2011.

GOOVAERTS, I. G. et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 729-38, Mar 15 2009.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of ivf in cattle--an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-25, Jan 7 2006.

HAQUE, T.; NAKADA, S.; HAMDY, R. C. A review of fgf18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 1, p. 97-105, Jan 2007.

HARRIS, D.; HUANG, B.; OBACK, B. Inhibition of map2k and gsk3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors. **Biol Reprod**, v. 88, n. 3, p. 74, Mar 2013.

HASHIMOTO, N. et al. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. **Nature**, v. 370, n. 6484, p. 68-71, Jul 7 1994.

HIRAYAMA, H. et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1108-15, May 2014.

HOLM, P. et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Reproduction**, v. 50, n. 8, p. 1285-1299, 1998.

HSIEH, M.; CONTI, M. G-protein-coupled receptor signaling and the egf network in endocrine systems. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 7, p. 320-6, Sep 2005.

HU, M. C. et al. Fgf-18, a novel member of the fibroblast growth factor family, stimulates hepatic and intestinal proliferation. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 10, p. 6063-74, Oct 1998.

HUANG, J. C. et al. Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. **Hum Reprod**, v. 19, n. 12, p. 2900-6, Dec 2004.

HUANG, X. et al. Establishment of bovine trophoblast stem-like cells from in vitro-produced blastocyst-stage embryos using two inhibitors. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 13, p. 1501-14, Jul 1 2014.

HYTTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, Jan 1 1997.

IGARASHI, M. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (fgf)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (fgf-7). **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13230-13235, 1998.

IMAMURA, T. Physiological functions and underlying mechanisms of fibroblast growth factor (fgf) family members: Recent findings and implications for their pharmacological application. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 7, p. 1081-1089, Jul 2014.

ITOH, N. Hormone-like (endocrine) fgfs: Their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. **Cell Tissue Res**, v. 342, n. 1, p. 1-11, Oct 2010.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Evolution of the fgf and fgfr gene families. **Trends Genet**, v. 20, n. 11, p. 563-9, Nov 2004.

_____. Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J Biochem**, v. 149, n. 2, p. 121-30, Feb 2011.

JIANG, Z. et al. Divergence of intracellular signaling pathways and early response genes of two closely related fibroblast growth factors, fgf8 and fgf18, in bovine ovarian granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 375, n. 1-2, p. 97-105, Aug 15 2013.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage

and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741-56, Sep 15 2000.

KOJI SUGIURA, Y.-Q. S., FRANCISCO J. DIAZ, STEPHANIE A. PANGAS, SHWETA SHARMA, KAREN WIGGLESWORTH,; MARILYN J. O'BRIEN, M. M. M., SHUNICHI SHIMASAKI AND JOHN J. EPPIG. Oocyte-derived bmp15 and fgfs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 134, p. 2593-2603, 2005.

KONECZNY, I. et al. Autocrine fibroblast growth factor 18 signaling mediates wnt-dependent stimulation of cd44-positive human colorectal adenoma cells. **Mol Carcinog**, Mar 12 2014.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. E14-23, 2004.

KUBISCH, H. M.; JOHNSON, K. M. The effects of blastomere biopsy and oxygen tension on bovine embryo development, rate of apoptosis and interferon-tau secretion. **Reprod Domest Anim**, v. 42, n. 5, p. 509-15, Oct 2007.

KUBISCH, H. M. et al. Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **Anim Reprod Sci**, v. 66, n. 1-2, p. 1-13, Apr 30 2001.

KUBISCH, H. M.; RASMUSSEN, T. A.; JOHNSON, K. M. Interferon-tau in bovine blastocysts following parthenogenetic activation of oocytes: Pattern of secretion and polymorphism in expressed mrna sequences. **Mol Reprod Dev**, v. 64, n. 1, p. 79-85, Jan 2003.

LAVRANOS, T. C. et al. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: The effects of basic fibroblast growth factor and dibutylryl camp on cell division and differentiation. **Exp Cell Res**, v. 211, n. 2, p. 245-51, Apr 1994.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J Anim Sci**, v. 48, n. 1, p. 76-86, Jan 1979.

LIM, H. et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via ppardelta. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1561-74, Jun 15 1999.

LIU, Z. et al. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. **Genes Dev**, v. 16, n. 7, p. 859-69, Apr 1 2002.

LOK, B. H.; POWELL, S. N. Molecular pathways: Understanding the role of rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 23, p. 6400-6, Dec 1 2012.

LONERGAN, P. et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biol Reprod**, v. 54, n. 6, p. 1420-9, Jun 1996.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, Jan 1 2008.

MACHADO, G. M. et al. Morphology, sex ratio and gene expression of day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 4, p. 600-8, 2013.

MAREI, W. F. et al. Role of ptgs2-generated pge2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reprod Biomed Online**, v. 28, n. 3, p. 388-400, Mar 2014.

MARUOKA, Y. et al. Comparison of the expression of three highly related genes, fgf8, fgf17 and fgf18, in the mouse embryo. **Mech Dev**, v. 74, n. 1-2, p. 175-7, Jun 1998.

MENG, Q. H. et al. Genetic variants in the fibroblast growth factor pathway as potential markers of ovarian cancer risk, therapeutic response, and clinical outcome. **Clin Chem**, Oct 21 2013.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651-74, Jan 15 2003.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; GOETZ, R. A protein canyon in the fgf-fgf receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs. **Curr Opin Struct Biol**, v. 15, n. 5, p. 506-16, Oct 2005.

MORI, Y. et al. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. **J Biol Chem**, v. 289, n. 14, p. 10192-200, Apr 4 2014.

MOSCATELLI, D. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: Absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. **J Cell Physiol**, v. 131, n. 1, p. 123-30, Apr 1987.

NAGAYAMA, T. et al. Fgf18 accelerates osteoblast differentiation by upregulating bmp2 expression. **Congenit Anom (Kyoto)**, v. 53, n. 2, p. 83-8, Jun 2013.

NAVARRO, E. M. F. A. A. V. P. R. A. F. V. M. R. A. F. P. A. D. A. S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: Aquisição de competência. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 172-181, 2008.

NEUFELD, G.; GOSPODAROWICZ, D. The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. **J Biol Chem**, v. 260, n. 25, p. 13860-8, Nov 5 1985.

NUTTINCK, F. et al. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domest Anim Endocrinol**, v. 27, n. 2, p. 179-95, Aug 2004.

OCHSNER, S. A. et al. Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and ep2 null mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 1008-19, Mar 2003.

OHBAYASHI, N. Structure and expression of the mrna encoding a novel fibroblast growth factor, fgf-18. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18161-18164, 1998.

OHBAYASHI, N. et al. Fgf18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. **Genes Dev**, v. 16, n. 7, p. 870-9, Apr 1 2002.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001.

PAKRASI, P. L.; JAIN, A. K. Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 79, n. 1-2, p. 27-33, Jul-Aug 2008.

PARK, J. Y. et al. Egf-like growth factors as mediators of lh action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-4, Jan 30 2004.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod**, v. 38, n. 5, p. 1171-80, Jun 1988.

PAUL, S.; KNOTT, J. G. Epigenetic control of cell fate in mouse blastocysts: The role of covalent histone modifications and chromatin remodeling. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 2, p. 171-82, Feb 2014.

PENG, X. R. et al. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3200-7, Dec 1991.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693-705, Oct 15 2013.

POMINI PINTO, R. et al. Effects of fgf10 on bovine oocyte meiosis progression, apoptosis, embryo development and relative abundance of developmentally important genes in vitro. **Reprod Domest Anim**, Dec 13 2014.

PORTELA, V. M. et al. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. **Biol Reprod**, v. 92, n. 1, p. 14, Jan 2015.

PORTELA, V. M. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 83, n. 3, p. 339-46, Sep 2010.

PROCHAZKA, R. et al. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion, and f-actin remodeling. **Mol Reprod Dev**, v. 56, n. 1, p. 63-73, May 2000.

REINHOLD, M. I. et al. Fgf18 represses noggin expression and is induced by calcineurin. **J Biol Chem**, v. 279, n. 37, p. 38209-19, Sep 10 2004.

RICHARDS, J. S. et al. Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annu Rev Physiol**, v. 64, p. 69-92, 2002.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for

blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002.

SANCHEZ, F. et al. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 9, p. 539-50, Sep 2009.

SAWYER, H. R. et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biol Reprod**, v. 66, n. 4, p. 1134-50, Apr 2002.

SCHAUSER, K. H. et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: Cyclic variation of the angiotensin ii receptor expression. **Biol Reprod**, v. 65, n. 6, p. 1672-80, Dec 2001.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211-25, Oct 13 2000.

SHIMADA, M. et al. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: Key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 6, p. 1352-65, Jun 2006.

SIQUEIRA, L. C. et al. Angiotensin ii, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1779-87, Jun 2012.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-54, Apr 1 2001.

SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and ivf in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 417-426, Apr 1996.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-36, Jan 7 2006.

SMITZ, J. E.; CORTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 185-202, Feb 2002.

SONGSASEN, N. et al. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reprod Domest Anim**, v. 44 Suppl 2, p. 65-70, Jul 2009.

SONVILLA, G. et al. Fibroblast growth factor receptor 3-iiic mediates colorectal cancer growth and migration. **Br J Cancer**, v. 102, n. 7, p. 1145-56, Mar 30 2010.

SONVILLA, G. et al. Fgf18 in colorectal tumour cells: Autocrine and paracrine effects. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 1, p. 15-24, Jan 2008.

SPILLER, C. M.; BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Regulation of germ cell meiosis in the fetal ovary. **Int J Dev Biol**, v. 56, n. 10-12, p. 779-87, 2012.

SPIVAK-KROIZMAN, T. et al. Heparin-induced oligomerization of fgf molecule is responsible for fgf receptor dimerization, activation, and cell proliferation. **Cell**, v. 79, p. 1015-1024, 1994.

STEPANENKO, A. A.; VASSETZKY, Y. S.; KAVSAN, V. M. Antagonistic functional duality of cancer genes. **Gene**, v. 529, n. 2, p. 199-207, Oct 25 2013.

SUDIMAN, J. et al. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103563, 2014.

SUGIURA, K. et al. Oocyte-derived bmp15 and fgfs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 134, n. 14, p. 2593-603, Jul 2007.

SUTTON-MCDOWALL, M. L. et al. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. **Biol Reprod**, v. 87, n. 4, p. 87, Oct 2012.

TAKAHASHI, T. et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin e(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 281, n. 48, p. 37117-29, Dec 1 2006.

TAMURA, A. N.; HUANG, T. T.; MARIKAWA, Y. Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. **Biol Reprod**, Sep 11 2013.

THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: Current methods and perspectives. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, n. 3, p. 235-42, May-Jun 2005.

VAIRAPANDI, M. et al. Gadd45b and gadd45g are cdc2/cyclinb1 kinase inhibitors with a role in s and g2/m cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. **J Cell Physiol**, v. 192, n. 3, p. 327-38, Sep 2002.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUWA, A. M. et al. Effects of different reproduction techniques ai, moet or ivp, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 575-597, 1999.

VANDERHYDEN, B. C. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). **J Reprod Fertil**, v. 98, n. 1, p. 219-27, May 1993.

VIANA, J. H. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effects on brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661-674, 2010.

WATSON, A. J. et al. Gene expression regulating blastocyst formation. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 117-33, Jan 1 1999.

WEI, W. et al. Fgf18 as a prognostic and therapeutic biomarker in ovarian cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 14, 2013.

WHITFIELD, Z. J. et al. A meiosis-specific form of the apc/c promotes the oocyte-to-embryo transition by decreasing levels of the polo kinase inhibitor matrimony. **PLoS Biol**, v. 11, n. 9, p. e1001648, Sep 2013.

WIGGLESWORTH, K. et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Sep 5 2013.

XIAO, X. et al. Effect of addition of fsh, lh and proteasome inhibitor mg132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (bos grunniens) oocytes. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 30, 2014.

XU, J.; CHAUBAL, S. A.; DU, F. Optimizing ivf with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 39-47, Jan 1 2009.

YAMADA, C. et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Anim Reprod Sci**, v. 99, n. 3-4, p. 384-8, Jun 2007.

YAMASHITA, Y. et al. Positive feedback loop between prostaglandin e2 and egf-like factors is essential for sustainable activation of mapk3/1 in

cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. **Biol Reprod**, v. 85, n. 5, p. 1073-82, Nov 2011.

YAMASHITA, Y.; SHIMADA, M. The release of egf domain from egf-like factors by a specific cleavage enzyme activates the egfr-mapk3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 5, p. 510-514, Oct 2012.

YANG, Q. E. et al. Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocyst outgrowths. **Biol Reprod**, v. 85, n. 5, p. 946-53, Nov 2011.

YANG, X. et al. Control of oocyte maturation in cows--biological factors. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 471-82, Jan 15 1998.

YASUO, H.; HUDSON, C. Fgf8/17/18 functions together with fgf9/16/20 during formation of the notochord in ciona embryos. **Dev Biol**, v. 302, n. 1, p. 92-103, Feb 1 2007.

YE, X. F. et al. Caffeine and dithiothreitol delay ovine oocyte ageing. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 8, p. 1254-61, 2010.

ZAMBRANO, E. et al. Fetal programming of sexual development and reproductive function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 1, p. 538-49, Jan 25 2014.

ZHANG, K.; EALY, A. D. Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent embryonic development. **Domest Anim Endocrinol**, v. 42, n. 4, p. 230-8, May 2012.

ZHANG, K.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 815-26, Dec 2010.

ZHANG, X. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian fgf family. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 15694-700, Jun 9 2006.

ZHANG, X. et al. Porcine oocytes denuded before maturation can develop to the blastocyst stage if provided a cumulus cell-derived coculture system. **J Anim Sci**, v. 88, n. 8, p. 2604-10, Aug 2010.

ZHONG, W. et al. Fgf ligand family mrna expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 5, p. 540-50, May 2006.

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced glut1 expression in igf1-/- null oocytes and follicles. **Growth Horm IGF Res**, v. 10, n. 3, p. 111-7, Jun 2000.